

**Untersuchungen zum Genom und dem immunologisch
aktiven D-Tryptophan im probiotischen
Lactobacillus casei W56 im Vergleich mit anderen
probiotischen Lactobacillen**

Kerstin Hochwind

Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktionen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Kirsten Jung

Eingereicht am: 18.12.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2014

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen:

Hochwind K, Weinmaier T, Schmid M, Van Hemert S, Hartmann A, Rattei T, Rothballer M. 2012. Draft genome sequence of *Lactobacillus casei* W56. *Journal of Bacteriology* **194**: 6638.

Kepert I, Fonseca J, Müller C, Hochwind K, Dehmel S, Nathan P, Milger K, Eickelberg O, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P, et al. Screening supernatants of probiotic bacterial supernatants reveals D-Tryptophan as soluble compound with immune modulatory activity. *Eingereicht.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
A Einleitung	9
A.1 Das menschliche Mikrobiom	9
A.2 Die Ökologie des humanen Darms	11
A.3 Probiotische Bakterien	13
A.3.1 Definition und praktische Relevanz	13
A.3.2 Wichtige Vertreter der heute bekannten Probiotika	13
A.4 Probiotische Mechanismen und die menschliche Gesundheit	15
A.5 Die probiotischen Stämme <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG und <i>Lactobacillus casei</i> W56	18
A.6 Ziele dieser Arbeit	21
B MATERIAL UND METHODEN	23
B.1 Kultivierung der Mikroorganismen	23
B.1.1 Anzucht der Bakterienstämme	23
B.1.2 Verwendete Medien und Antibiotika	25
B.1.2.1 Vollmedien	25
B.1.2.2 Definiertes Medium für Gram-positive Bakterien	26
B.1.2.3 Eingesetzte Antibiotika	28
B.1.3 Ernte zellfreier Überstände	28
B.1.4 Photometrische Bestimmung der Zelldichte und Erstellen von Wachstumskurven	28
B.1.5 Biochemische Identifizierung der Bakterienstämme mit Hilfe eines API-Testsystems	29
B.2 Molekularbiologische Methoden	29
B.2.1 Verwendete Plasmide	29
B.2.2 DNS-Isolierung und Konzentrationsbestimmung	30
B.2.2.1 DNS-Isolierung aus Reinkultur	30
B.2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung	31
B.2.2.3 Konzentrationsbestimmung mit PicoGreen	31
B.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
B.2.3.1 Primerdesign	31
B.2.3.2 Standard-PCR	33
B.2.3.3 Aufreinigung der Produkte und Auftrennung über Gelelektrophorese	34
B.2.3.4 Vorbereitung der „DNA-Library“ und anschließende Emulsion PCR (emPCR)	35
B.2.3.5 Klonierung von PCR-Produkten in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen	36
B.2.4 Sequenzierung	37
B.2.4.1 Vorbereitungen für Sanger DNS-Sequenzierung	37
B.2.4.2 454-Pyrosequenzierung	38
B.2.5 Enzymatische Modifikation von DNS	39
B.2.5.1 Restriktionsverdau	39
B.2.5.2 Dephosphorylierung	39
B.2.5.3 Ligation	40

B.2.6	Insertion eines Tetracyclinresistenz-Gens mit Hilfe des Transposons (Tn) 5.....	40
B.2.7	Elektrotransformation.....	41
B.2.7.1	Herstellung elektrokompenter <i>L. casei</i> W56 Zellen	41
B.2.7.2	Transformation elektrokompenter <i>L. casei</i> W56 Zellen.....	41
B.3	Bestimmung der Temperatursensitivität von pGh9 in <i>L. casei</i> W56	42
B.4	Grundlagen zur homologen Rekombination.....	43
B.4.1	Vorgehensweise für das Plasmid pGh9	43
B.4.2	Vorgehensweise für das Plasmid pEX18Ap	43
B.5	Bioinformatische Auswertung	44
B.5.1	Manuelle Überprüfung der Sequenzen und Erstellung von Konsensussequenzen.....	44
B.5.2	Auswertung mit Newbler und RAST	44
B.5.3	Bioinformatische Aufarbeitung der sequenzierten Genome.....	45
B.6	High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)	45
B.6.1	Vorbereitung der Proben für den Einsatz in der HPLC durch Festphasenextraktion (SPE)	46
B.6.2	Aufkonzentrierung in der Vakuumzentrifuge	46
B.6.3	HPLC basierende Analytik zur Trennung von D- und L-Tryptophan	46
C	Ergebnisse	48
C.1	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten verschiedener Gram-positiver probiotischer Bakterien.....	48
C.2	Identifikation von D-Tryptophan als immunologisch aktive Substanz	51
C.3	Entwicklung einer HPLC-basierten Analytik zur Untersuchung der D-Trp-Produktion in bakteriellen Zellüberständen	52
C.3.1	Erstellen der Standardgerade	52
C.3.2	Ermittlung des optimalen Elutionsvolumens für die SPE und Berechnung der Rückgewinnungsrate	54
C.3.3	Kapazität der SPE-Säule	55
C.3.4	Bestimmung der neuen Detektionsgrenze als Folge der Optimierungsschritte.....	56
C.3.5	Messungen der Zellüberstände von Kulturen von <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. casei</i> W56 und <i>L. rhamnosus</i> W102 auf das Vorhandensein von D-Trp.....	58
C.3.6	L-Trp Konzentration	59
C.4	Genomsequenzierung <i>L. casei</i> W56 und <i>L. rhamnosus</i> W102	62
C.4.1	Auswahlkriterien und vorläufige phylogenetische Einordnung der verwendeten Stämme	62
C.4.2	DNS-Libraries	66
C.4.3	454-Pyrosequenzierung.....	67
C.4.4	Bioinformatische Auswertung der Genomsequenzierungen	70
C.4.5	Verbinden der verbliebenen Contigs aus <i>L. casei</i> W56	70
C.4.5.1	Zusammenführen der chromosomalen Contigs.....	70
C.4.5.2	Schließen der Lücken zwischen den Plasmid-Contigs	72
C.4.6	Überprüfen der Positionen und Richtungen der Transposons	75
C.4.7	Vergleich der Racemasen in den Sequenzen von <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. casei</i> W56 und <i>L. rhamnosus</i> W102	77
C.5	Generierung einer Knock-Out-Mutante des Gens <i>trpC</i> in <i>L. casei</i> W56	79
C.5.1	Auswahl geeigneter Antibiotika als Selektionsmarker für die Mutanten	80
C.5.2	Bestimmung der maximalen Wachstumstemperatur von <i>L. casei</i> W56	81
C.5.3	Elektrotransformation von <i>L. casei</i> W56 mit dem Plasmid pGh9	82

C.5.4	Verlust des Plasmids pGh9 aus <i>L. casei</i> W56 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur	83
C.5.5	Konstruktion geeigneter Plasmide für die homologe Rekombination.....	84
C.5.5.1	Amplifikation der zu <i>trpC</i> homologen Region und Klonierung in pSC-A	84
C.5.5.2	Einführung der Tetracyclinresistenz in die Insertionskassette ...	85
C.5.5.3	Übertragung der Kassette in pGh9 und pEX18Ap	87
C.5.6	Elektrotransformation der Plasmide pGh9- <i>trpC</i> -Tn5 und pEX18Ap- <i>trpC</i> -Tn5 in <i>L. casei</i> W56	88
D	Diskussion.....	90
D.1	Die Aminosäure Tryptophan und D-Aminosäuren.....	90
D.2	Optimierung eines HPLC-basierten Testsystems für den quantitativen Nachweis von D-Tryptophan.....	94
D.3	Genomische Erkenntnisse zu <i>L. casei</i> W56 und <i>L. rhamnosus</i> W102	97
D.3.1	Phylogenetische Einordnung	97
D.3.2	Sequenzierung und Annotation der Lactobacillen-Genome	98
D.3.3	Transposons in <i>L. casei</i> W56.....	99
D.3.4	Vergleich von Genen mit Relevanz für die Bakterien-Wirt-Interaktion probiotischer Lactobacillen.....	100
D.3.5	Vergleich möglicher am D-Tryptophan-Biosynthesewege beteiligter Gene.....	102
D.3.5.1	Racemasen.....	102
D.3.5.2	Indol-3-Phosphat-Dehydrogenase (<i>trpC</i>)	103
D.4	Entwicklung eines Gen-Knock-Out-Mutagenesesystems in <i>L. casei</i> W56 mit dem Plasmid pGh9- <i>trpC</i> -Tn5.....	103
D.4.1.1	Temperatursensitives Plasmid pGh9.....	104
D.4.1.2	Weitere Zielgene im Tryptophan-Biosyntheseweg	106
D.5	Weiterführender Ausblick	106
E	Zusammenfassung	108
F	Literaturverzeichnis	110
	Abbildungsverzeichnis	122
	Tabellenverzeichnis	125
G	Anhang	126
G.1	Ergebnisse der immunologischen und chemischen Analysen des Verbundprojekts	126
G.1.1	Bioassays zur Bestimmung immunmodulatorischer Aktivität bakterieller Überstände	126
G.1.2	Fraktionierungen.....	127
G.1.3	Identifikation des D-Isomers und Vergleiche mit anderen Aminosäuren..	130
G.2	API50	132
G.3	Sequenz der Insertionskassette	132
	Eidesstattliche Erklärung	134
	Danksagung.....	135
	Lebenslauf	136

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
bp	Basenpaare (base pairs)
CDMI	Chemisch definiertes Medium I
CPC	Comprehensive Pneumology Center
DC	Dendritische Zelle (Dendritic Cell)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
emPCR	Emulsion-PCR
Ery	Erythromycin
et al.	et alteri
GAC	Genome Analysis Center
H ₂ O _{dem}	Entionisiertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
Km	Kanamycin
Kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
Mbp	Megabasepaare (mega base pairs)
ME	Mosaiksequenz im Transposon Tn5
MeOH	Methanol
MRS	de Man, Rogosa und Sharpe- Medium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD _x	optische Dichte bei x nm Wellenlänge
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PES	Polyethersulfon
PP _i	Pyrophosphat
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)

SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
TARC	Thymus and activation regulated chemokine
Tc	Tetracyclin
Trp	Tryptophan
U	Units
VWF	von-Willebrand-Faktor
WT	Wildtyp

A Einleitung

A.1 Das menschliche Mikrobiom

Jeder Mensch trägt ca. 10 bis 100 Trillionen Mikroorganismen in seinem Körper. Die meisten davon im Darmtrakt, aber z. B. auch in der Lunge, dem Mund, der Vagina und auf der Haut. Zusammengefasst werden sie als humane Mikrobiota bezeichnet. Unter dem Begriff humanes Mikrobiom versteht man hingegen die Gene, die diese Zellen in sich tragen (Turnbaugh *et al.*, 2007). Erste Untersuchungen zum humanen Mikrobiom haben bereits Antonie van Leewenhoeck beschäftigt, wodurch die Frage nach Unterschieden in der Mikroorganismenzusammensetzung zwischen gesunden und kranken Menschen so alt ist, wie der Forschungsbereich der Mikrobiologie selbst (Leewenhoeck, 1684; Dobell, 1920).

Das menschliche Genom beinhaltet ca. 22 000 Gene, dem gegenüber stehen 3,3 Millionen nicht-redundante Gene im humanen Darm-Mikrobiom (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; Qin *et al.*, 2010). Während das menschliche Genom zwischen verschiedenen Individuen zu 99,9 % identisch ist, unterscheidet sich das Mikrobiom des Darms oder der Hand verschiedener Individuen um bis zu 90% (Wheeler *et al.*, 2008; Fierer *et al.*, 2008; Turnbaugh *et al.*, 2009). Die individuelle humane Mikrobiota wird durch verschiedene Einflüsse geprägt. Schon bei der Geburt zeigt sich, dass Kinder die auf natürlichem Wege geboren werden, kurz darauf ähnliche Mikroorganismen aufweisen wie sie in der Vagina ihrer Mutter zu finden sind. Bei Kindern die mit Hilfe eines Kaiserschnitts geboren werden findet man dagegen typische Mikroorganismen der menschlichen Haut (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Aber auch die Ernährung, Erkrankungen oder Antibiotikabehandlungen wirken sich stark auf die mikrobielle Gemeinschaft im Menschen aus (Koenig *et al.*, 2011).

Die mikrobielle Vielfalt ist auch in verschiedenen Bereichen des Körpers sehr unterschiedlich. Dabei weisen Mund und Darmtrakt die größte Vielfalt an Mikroorganismen auf (Costello *et al.*, 2009). Man muss daher von Habitat spezifischen Mikrobiomen innerhalb eines Individuums sprechen. In Abb. A.1 sind vier dieser Habitate als Diagramme dargestellt. Die großen Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung sind hier deutlich zu erkennen.

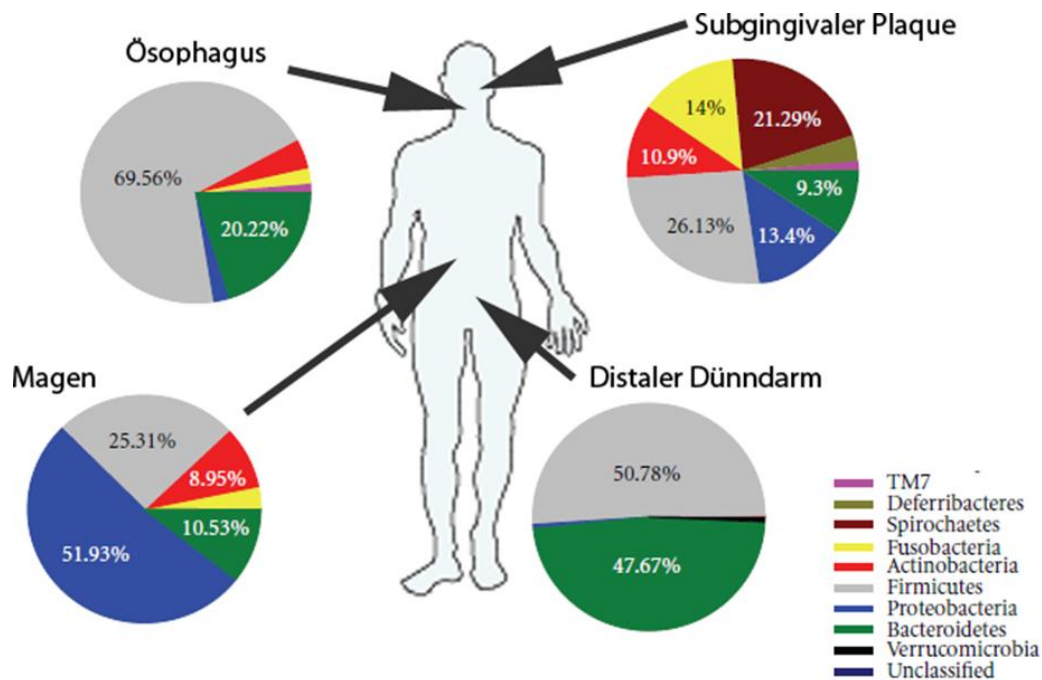


Abb. A.1 Vier Bereiche des menschlichen Körpers und ihre mikrobielle Zusammensetzung im Vergleich (Abbildung aus Harris *et al.*, 2012, modifiziert)

Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass sich die Zusammensetzung der menschlichen Mikrobiota stark von der freilebender Bakteriengemeinschaften unterscheidet. Vor allem im Darmtrakt gibt es starke Unterschiede zu anderen Habitaten und man kann den Darm, aufgrund des Sauerstoffgehalts und des pH-Wertes, durchaus als extremes Habitat bezeichnen. Allerdings wurde festgestellt, dass andere extreme Habitats, wie zum Beispiel heiße Quellen, in ihrer Bakterienzusammensetzung milderen Umgebungen ähneln. Es zeigte sich, dass sich die Zusammensetzung und die Eigenschaften der mikrobiellen Gene mit den entsprechenden Wirtsorganismen koevolviert haben. Dadurch würde der große Unterschied zwischen den menschlichen Mikrobiota und dem extremer Umwelthabitats erklärt werden (Lozupone & Knight, 2007; Ley *et al.*, 2008). Wegen der engen Wechselwirkungen zwischen dem eukaryotischen Wirt (Mensch, Tier oder Pflanze) und seiner Mikroflora spricht man auch vom „Holobionten“ als einer Art „Superorganismus“. Die relativ schnellen Veränderungen im Mikrobiom könnten eine entscheidende Rolle bei der Anpassung und Evolution des Holobionten spielen. Denn sie könnten es dem Holobionten ermöglichen, sich schneller und besser an sich verändernde Bedingungen anzupassen (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Bei Pflanzen konnte gesehen werden, dass ihre mikrobielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre häufig essentiell für die Gesundheit der Pflanze ist, weswegen man auch vom zweiten Genom der Pflanze spricht (Berendsen *et al.*, 2012). Bakterien des menschlichen

Verdauungstraktes beteiligen sich nicht nur am Abbau von spezifischen Nahrungsmitteln, sondern haben auch Anteil an der Entwicklung und der normalen Funktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Hooper, 2001; O'Hara & Shanahan, 2006). Allerdings kann diese Symbiose schnell durch eine Störung des Gleichgewichts in eine sogenannte Dysbiose (auch Dysbakteriose) gewandelt werden. Dysbiotische Mikrobiota sind anfällig für die Besiedelung und starke Vermehrung von Pathogenen und sind ein möglicher Auslöser für viele Krankheiten (Stecher *et al.*, 2013).

Dies zeigt deutlich, wie viel die Gene der Mikroorganismen auch zur Anpassung des Menschen in vielen Bereichen beitragen und dadurch nicht zuletzt von evolutionärem Vorteil sein können.

A.2 Die Ökologie des humanen Darms

Das Mikrobiom des menschlichen Darms unterscheidet sich deutlich von dem anderer Körperbereiche. Der Darm von Säugetieren gliedert sich in verschiedene Abschnitte, die vor allem dem Verdau von Nahrung dienen. Am Anfang stehen Magen, Duodenum und Jejunum deren Hauptaufgabe der Aufschluss von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten, die Sekretion von Säuren und die Aufnahme von Monosachariden, Fettsäuren, Vitaminen, Mineralstoffen und Aminosäuren ist. Der längste Abschnitt ist das Ileum. Hier findet die Hauptaufnahme von Nährstoffen in den Körper statt. Der letzte Schritt der Nahrungszersetzung bis hierher unverdauter Substanzen findet im Caecum und Colon statt. Vor allem durch eine große Anzahl an anaeroben Mikroorganismen. Die Hauptaufgabe dieser Bereiche ist jedoch die Rückgewinnung von Wasser und Elektrolyten.

Die Menge an Bakterien steigt zum Ende des Darms an. Während im Duodenum 10^4 - 10^5 Bakterien/ g Darmfüllung (Frischgewicht) leben, sind es im Caecum und Colon 10^{10} - 10^{11} Bakterien/ g Darmfüllung. Des Weiteren gibt es auch Gradienten für die Menge an Enzymen, den pH-Wert und den Sauerstoffgehalt (Dos Santos *et al.*, 2010). Dies hat zur Folge, dass sich auch die mikrobielle Zusammensetzung in den einzelnen Darmabschnitten unterscheidet.

Im Dünndarm finden sich Bacteroidetes und Clostridien, die mit der Mucosa in enger Verbindung stehen. Im Lumen kommen auch Enterobacteriaceen vor (Hayashi *et al.*, 2005). Die meisten der im Dickdarm mit der Mucosa verbundenen Bakterien zählen ebenfalls zu den Bacteroidetes und Firmicutes (Eckburg *et al.*, 2005). Daneben finden sich aber auch Actinobakterien, Verrucomicrobia, wie zum Beispiel das im Zusammenhang mit dem menschlichen Körpergewicht stehende symbiotische Bakterium *Akkermansia muciniphila*, und

einige weniger abundante Phyla wie Proteobakterien und Fusobakterien (Eckburg *et al.*, 2005; Everard *et al.*, 2013). In Abb. A.2 sind die Abschnitte des Darms mit den jeweiligen Bedingungen und der vorwiegenden Mikrobiota dargestellt.

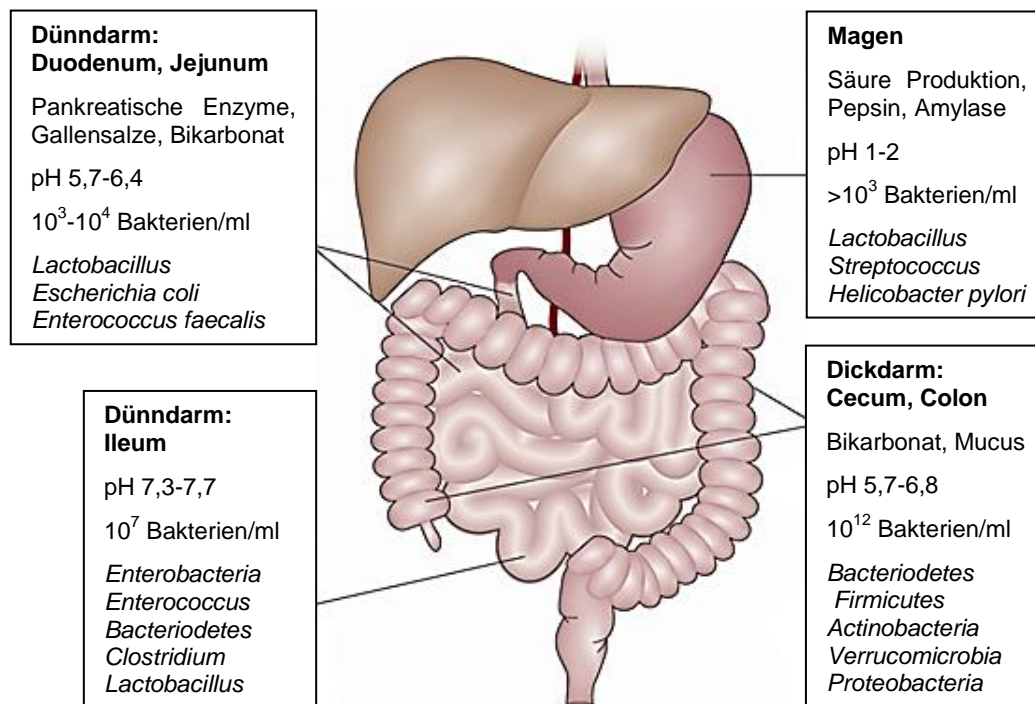


Abb. A.2 Charakteristiken des gesunden humanen Darms (Walter & Ley, 2011; Aron-Wisniewsky *et al.*, 2012)

Der menschliche Darm besitzt verschiedene Mechanismen um die Besiedelung durch Mikroorganismen zu regulieren. Beispielsweise wirken die sekretierten Gallensalze des Duodenums bakterizid und der niedrige pH-Wert, sowie der schnelle Lumenfluss limitieren das bakterielle Wachstum (Kanno *et al.*, 2009). Darüber hinaus produziert der Mensch auch einige antimikrobielle Substanzen in allen epithelialen Zelllinien, zum Beispiel Defensine und Cathelicidine (Cash *et al.*, 2006; Hooper & Macpherson, 2010). Ein anderes Mittel zur Kontrolle der Mikroflora sind Immunglobuline (Ig), darunter vor allem IgA. Dieses erkennt die dominanten Bakterien und limitiert die Penetration der Mucosa. Der genaue Mechanismus, der hier zu Grunde liegt ist jedoch noch nicht aufgeklärt (Hapfelmeier *et al.*, 2010). Die Mucosa ist ein stark wasserhaltiges Gel (~95%), das aus großen Glycoproteinen, den Mucinen, aufgebaut ist. Mikroorganismen die mit Mucinen verbunden sind, profitieren von dieser Verbindung nicht nur durch eine verlängerte Adhäsionszeit. So sind einige probiotische Bakterien, wie *Akkermansia muciniphila*, in der Lage, Mucine abzubauen und diese als Substrate für ihr

Wachstum zu nutzen. Dadurch wird die Besiedelung durch solche Bakterien selektiv begünstigt. Dabei wirkt die Mucusschicht gleichzeitig als Barriere gegenüber pathogenen Bakterien (Derrien *et al.*, 2010).

A.3 Probiotische Bakterien

A.3.1 Definition und praktische Relevanz

Der Mensch hat sich die Fähigkeiten der Mikroorganismen z.B. bei der Lebensmittelerzeugung schon seit den Frühzeiten der Entwicklung von Zivilisationen zu Nutze gemacht. In den letzten Jahren ist das Interesse besonders auch an gesundheitsfördernden Nahrungsmitteln stark gestiegen. Laut Euromonitor (www.euromonitor.com) betrug im Jahr 2007 der globale Umsatz für probiotische Milchdrinks 10,2 Milliarden Dollar. Allein in Deutschland stieg der Umsatz von Molkereiprodukten, die probiotische Mikroorganismen enthalten von 2004 bis 2008 um 34 % (Quelle: IBH Retail Consultants). Probiotische Bakterien sind definiert als lebende Mikroorganismen, die in entsprechenden Mengen einen gesundheitsfördernden Effekt auf den Wirt haben (FAO/WHO, 2006). Trotz der mittlerweile weiten Verbreitung in unserem täglichen Leben ist jedoch noch immer relativ wenig über Funktion und Wechselwirkungen von probiotischen Bakterien mit dem Wirtsorganismus bekannt.

Eine Verbindung zwischen Lactobacillen und der menschlichen Gesundheit wurde bereits im späten 19. Jahrhundert von dem russischen Nobelpreisträger Ilja Iljitsch Metschnikow vermutet (Gordon, 2008). Außer in Lebensmitteln befinden sie sich heute als gesundheitsfördernder Bestandteil in weiteren Produkten. So etwa in Zahnpasta, als Schutz gegen Karies oder in Tabletten zur Steigerung der körpereigenen Abwehrkräfte.

A.3.2 Wichtige Vertreter der heute bekannten Probiotika

Bei den meisten der bekannten probiotischen Bakterien handelt es sich um Lactobacillen. Unter ihnen sind vor allem *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota (DSM 20312), *L. casei* DN-114 001 und *L. johnsonii* La1 hervorzuheben und besonders gut untersucht. Die drei letztgenannten sind in Deutschland in den Milchprodukten Yakult®, Actimel® und LC1® enthalten. Laut Herstellerangaben sollen sie die Immunabwehr des Konsumenten stärken. Tatsächlich konnte für diese Stämme auch durch wissenschaftliche Studien probiotisches Potential belegt werden. Aus der Vielzahl an durchgeführten Untersuchungen zu diesen

Bakterien können hier nur wenige Beispiele aufgezeigt werden, auf *L. rhamnosus* GG wird in A.5 genauer eingegangen.

Eine der wissenschaftlichen Studien, die zu den gesundheitsfördernden Effekten von *L. johnsonii* La1 publiziert wurde, zeigt, dass durch die Verabreichung des Bakteriums bei älteren Mäusen, die unter dem „Protein-Energie-Mangelsyndrom“ leiden, die Produktion des Immunglobulins A gesteigert wird und es unterstützte damit die Stabilisierung des Ernährungszustandes, sowie des Immunsystems (Kaburagi *et al.*, 2007). Das „Protein-Energie-Mangelsyndrom“ tritt häufig bei älteren Menschen auf und führt zu Fehlfunktionen des Immunsystems. Eine der dokumentierten, probiotischen Eigenschaften von *L. casei* Shirota ist die Reduzierung der Kolonisierungsrate von dem pathogenen *Helicobacter pylori* in Mäusen (Sgouras *et al.*, 2004). *L. casei* DN-114 001 ist, selbst als Lysat, in der Lage die Barrierefunktion der Darmwand zu stärken und dadurch die Symptome chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen zu lindern (Zakostelska *et al.*, 2011).

Unter den probiotischen Bakterien mit hoher Verbreitung, die nicht zu den Lactobacillen zählen ist *Escherichia coli* Nissle 1917, das in dem Produkt Mutaflor® enthalten ist, besonders hervorzuheben. Es wird bereits als nebenwirkungsarme therapeutische Option für Patienten mit unterschiedlichen Typen des Reizdarmsyndroms gehandelt (Plassmann & Schulte-Witte, 2007). Eine weitere bedeutende Gruppe probiotischer Bakterien ist die der Bifidobakterien. Ein gut untersuchter Vertreter daraus ist *Bifidobacterium lactis* BB12. Für ihn konnte gezeigt werden, dass er sich positiv auf frühgeborene Kinder, zum Beispiel durch eine Erhöhung des Körpergewichts, auswirkt (Mohan *et al.*, 2008).

Auch in der Tierernährung sind Probiotika weit verbreitet. Hier kommt vor allem der Stamm *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 zum Einsatz. Unter anderem wurde für dieses Bakterium gezeigt, dass es in der Lage ist, den Virus der Schweinegrippe zu hemmen. Dieser verursacht weltweit einen enormen ökonomischen Schaden und kann auch auf den Menschen übertragen werden (Wang *et al.*, 2013). Verschiedene *Bacillus subtilis* Stämme spielen vor allem in der Hühneraufzucht eine immer größer werdende Rolle. Denn beispielsweise kann *Bacillus subtilis* DSM17299 die Kolonisierung mit Salmonellen in Hühnern reduzieren. Dies ist nicht nur für die Gesundheit der Tiere von Vorteil, sondern auch für die Sicherheit unserer Lebensmittel (Knap *et al.*, 2011).

Es gibt noch viele weitere potentiell probiotische Bakterien, jedoch sind nur wenige etabliert. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) einige ungünstige Urteile zu probiotischen Nutraceuticals gefällt hat. Die Hauptgründe dafür lagen meist im Mangel an Informationen über die Identität der aktiven Substanz, die darin enthalten ist (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit, 2010).

Aber in vielen klinischen Studien konnten vor allem durch Lactobacillen positive Effekte für den Menschen festgestellt werden, zum Beispiel der Einsatz von *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (Kalliomäki *et al.*, 2003) oder *L. rhamnosus* 19070-2 in Kombination mit *L. reuteri* DSM 122460 (Rosenfeldt *et al.*, 2003) zur Linderung der Symptome bei Neurodermitis. In einer Arbeit von Chen *et al.*, 2010 konnte eine signifikante Verbesserung der klinischen Symptome bei Kindern mit Asthma durch *L. gasseri* A5 erreicht werden. Über die klassische Definition hinaus müssen probiotische Bakterien aber noch andere Kriterien erfüllen, um für den Menschen von medizinischem Nutzen zu sein. Sie müssen in der Lage sein die Magen- und Gallensäure zu überstehen und tolerant gegenüber dem im menschlichen Darm herrschenden Milieu sein, um sich dort erfolgreich etablieren zu können. Selbstverständlich dürfen sie für den Menschen nicht pathogen sein, um ihn als Wirt nicht zu schädigen (Boyle & Tang, 2006).

A.4 Probiotische Mechanismen und die menschliche Gesundheit

Bereits 2009 listeten Lomax & Calder 107 Studien auf, die sich mit den Auswirkungen von Probiotika auf das menschliche Immunsystem beschäftigten. Jedoch zeigen neben den zahlreichen Studien, die die Förderung der menschlichen Gesundheit durch probiotische Bakterien belegen, auch einige Studien keinen direkten positiven Einfluss der eingesetzten Bakterien (Toh *et al.*, 2012). Es ist jedoch ein in statistisch abgesicherten klinischen Studien erfolgter Nachweis über die Wirksamkeit notwendig, um die Bezeichnung „Probiotika“ führen zu können. Dieser steht noch für einige Stämme, die möglicherweise probiotisches Potential besitzen, aus. Für das uneinheitliche Bild der Ergebnisse aus den medizinischen Studien können verschiedene Gründe verantwortlich sein. Einerseits ist bekannt, dass die Wirkung stark stamm- und speziesspezifisch ist (Licciardi & Tang, 2011). Andererseits ist sicherlich auch ein Grund darin zu sehen, dass bisher nur wenig über die Wirkungsmechanismen, die hinter den Effekten stehen, bekannt ist.

Eine mögliche Einteilung gliedert die Wirkungsmechanismen in mikrobiologische, epitheliale und immunologische (Ölschläger, 2010). Zu den mikrobiologischen Mechanismen zählt die Produktion von Bakteriozinen, die spezifisch gegen Pathogene wirken. Ein Beispiel hierfür ist das von *L. acidophilus* La-14 produzierte Bakteriozin, das antimikrobiell gegen *Listeria monocytogenes* wirkt (Todorov *et al.*, 2011). Darüber hinaus können pathogene Organismen an der Besiedlung des Darms infolge einer Veränderung des pH-Wertes nach der Produktion von Essigsäure durch probiotische Bakterien gehindert werden (Asahara & Shimizu, 2004).

Auch kann die entstehende Konkurrenz um Nährstoffe dem Wachstum von Pathogenen und ihrer Entwicklung zum Nachteil sein und diese können so verdrängt werden (Fooks & Gibson, 2002).

Die epithelialen Wirkungsmechanismen beinhalten unter anderem die spezifische Bindung der Mikroorganismen an Rezeptoren des Wirtsepithels. Probiotika können auch hier mit Pathogenen in Konkurrenz treten. Die Bindung und Besiedelung der Darm-Mucosa wird als initialer Schritt bei der Kolonisierung und Infektion vieler pathogener Bakterien, z.B. *H. pylori*, angesehen. *H. pylori* bindet dabei an Rezeptoren der Zell-Zell-Verbindungen. Sind diese Bindungsstellen durch andere Mikroorganismen, wie *L. reuteri*, blockiert, können Infektionen verhindert werden (Mukai *et al.*, 2002). Außerdem können probiotische Bakterien die Durchlässigkeit des Darmepithels beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass sie die Expression von „Tight Junction“- und „Adherent Junction“-Proteinen regulieren können (Hummel *et al.*, 2012). Die „Tight Junctions“- und „Adherent Junctions“ verbinden die Epithelzellen miteinander und sorgen so für eine Diffusionsbarriere und halten das transepitheliale Spannungspotential aufrecht. Im Krankheitsfall ist dies häufig gestört.

Probiotika wirken auch direkt auf das Immunsystem. Ein wichtiger Bestandteil des humanen angeborenen Immunsystems ist die Phagozytose. Dabei werden körperfremde Zellen von phagozytischen Zellen, wie Monocyten oder neutrophilen Granulozyten, umschlossen und verdaut. *L. acidophilus* La1 und *Bifidobacterium bifidum* Bb12 sind in der Lage, die Aktivität der phagozytischen Zellen im Blut zu erhöhen (Schiffrin *et al.*, 1995, 1997). Ähnliches konnte auch Gill *et al.* (2001) für *L. rhamnosus* HN001 nachweisen. Gegen virale Infektionen nutzt der menschliche Körper sogenannte natürliche Killerzellen, die ebenfalls eine Untergruppe der Leukozyten sind. Auch ihre Aktivität kann durch probiotische Bakterien, wie den bereits genannten *L. casei* Shirota, stimuliert werden (Takeda & Okumura, 2007). Eine mögliche Ursache für die positiven Effekte auf die Gesundheit von Patienten mit Morbus Crohn durch *L. rhamnosus* könnte die Modulierung der Aktivität dendritischer Zellen (DC) sein. Durch reduzierte Ausschüttung von Interleukin (IL)-2, IL-10, CD25 und Interferon (IFN)- γ durch DC wird eine Hypersensitivität der T-Zellen induziert (Braat *et al.*, 2004). DCs sind die einzigen Zellen, die in der Lage sind die primäre Immunantwort zu induzieren, indem sie durch Ausschüttung von Cytokinen T-Zellen aktivieren.

Die Wirkungen probiotischer Bakterien sind noch viel weitreichender als die hier exemplarisch aufgeführten Effekte. Sie besitzen - allgemein ausgedrückt - die Fähigkeit direkt und indirekt auf das Immunsystem einzuwirken, aber auch auf den Stoffwechsel der Zellen oder die Barrierefunktion der Epithelien zu beeinflussen (Klaenhammer *et al.*, 2012). Zur

Verdeutlichung der hier aufgeführten Effekte von probiotischen Bakterien auf das menschliche Immunsystem zeigt Abb. A.3 eine schematische Zusammenfassung.

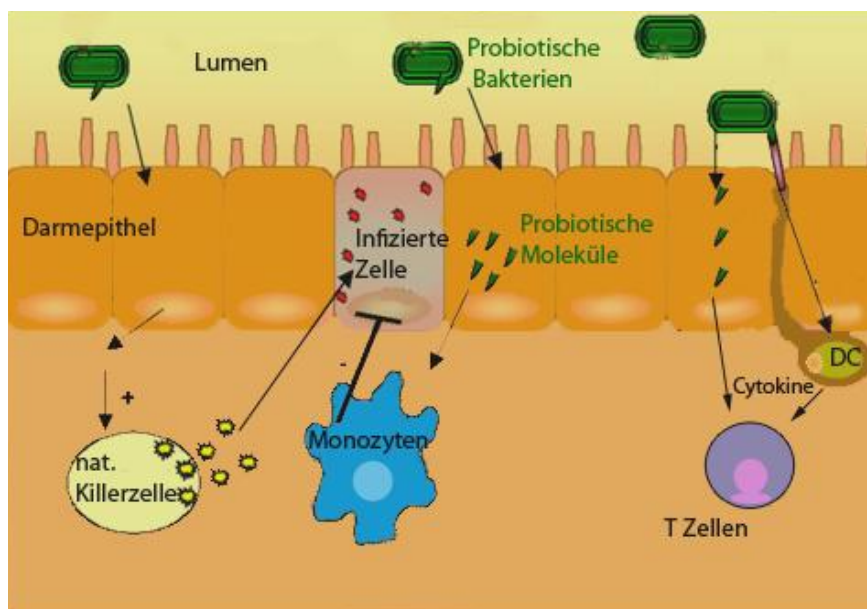


Abb. A.3 Schematische Darstellung probiotischer Effekte auf die humane Immunantwort

Wie eingangs erwähnt, sind die bisher durchgeführten Studien zu probiotischen Wirkungen sehr unterschiedlicher Natur. So unterscheidet sich der Aufbau der Studien sowohl in den Testpersonen (gesund, krank, medizinische Vorgeschichte, Alter uvm.), als auch in den verwendeten Bakterien und Dosen. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind daher vielfältig. Dies verdeutlicht erneut von welcher hohen Wichtigkeit es ist, Kenntnisse über die genauen Mechanismen und Ursachen für die beobachteten Effekte, zu erlangen. Denn trotz all dieser Untersuchungen sind noch immer nur wenige Mechanismen bekannt. Auch in Fällen, in denen das Grundprinzip erforscht wurde, stehen detaillierte Untersuchungen der Wirkungsmechanismen bzw. die Analytik der beteiligten Moleküle und des genetischen Hintergrunds noch aus. Untersuchungen auf Transkriptomebene bieten einen Ansatz neue Erkenntnisse darüber zu erlangen. Baarlen *et al.* (2010) liefern erste wichtige Einblicke darüber, wie unterschiedliche genregulierte Netzwerke in der menschlichen Mucosa *in vivo* von verschiedenen Lactobacillen beeinflusst werden. In dieser Publikation werden Genexpressionsprofile von Personen verglichen, die *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* oder ein Placebo eingenommen hatten. Dabei war die größte Variation in den Transkriptomen abhängig von der jeweiligen Person. Es wurde aber auch gesehen, dass die verschiedenen

Lactobacillen die Expression unterschiedlicher Gengruppen beeinflussen. Diese Erkenntnis ist der erste Ansatz, der die Bedeutung der personen-spezifischen Ernährung aufzeigt.

A.5 Die probiotischen Stämme *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Lactobacillus casei* W56

Lactobacillen spielen außer ihrer Rolle als Probiotika schon sehr lange eine wichtige Rolle in der Produktion vieler unserer Nahrungsmittel. Vor allem bei Milchprodukten wie Joghurt und Käse oder bei der Herstellung von Sauerkraut. Sie sind Bestandteil einer gesunden menschlichen Darm-, Vaginal- und Mundflora. Lactobacillen gehören zu den Gram-positiven Bakterien mit einem niedrigen GC-Gehalt. Sie sind aerotolerante Anaerobier, meist stäbchenförmig und liegen in Ketten zusammenhängend vor (Abb. A.4).

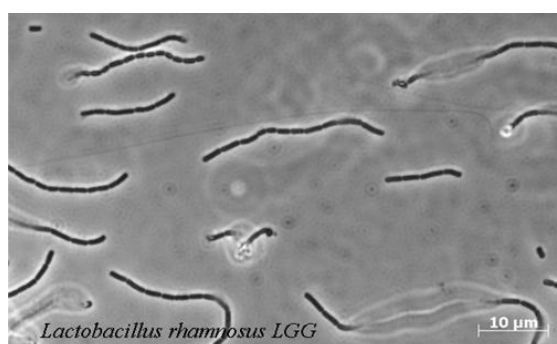


Abb. A.4 *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Im Gegensatz zu vielen anderen Milchsäurebakterien sind sie auch bei niedrigem pH-Wert (pH=4) noch in der Lage Lactat zu produzieren. Bei der Lebensmittelherstellung werden sie vor allem wegen ihrer Fähigkeit rohe Lebensmittel durch die Produktion von Säure zu konservieren, verwendet. Zugleich verleihen sie den Nahrungsmitteln charakteristischen Geschmack und Textur (Kleerebezem *et al.*, 2010).

Die in dieser Arbeit eingesetzten Stämme wurden Großteils von der Firma Winclove Bio Industries B.V. (Amsterdam, The Netherlands) bereitgestellt und werden dort als Bestandteil probiotischer Produkte eingesetzt. Besondere Bedeutung hatten in der vorliegenden Dissertation die Stämme *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* W102, sowie *L. casei* W56.

Der Stamm *Lactobacillus rhamnosus* GG, der 1985 von Gorbach und Goldin (1989) aus dem Darm eines gesunden Menschen isoliert wurde, gilt heute als der bestuntersuchte

probiotische Stamm. Im Jahr 2009 wurde die komplette Genomsequenz durch Morita *et al.* allgemein zugänglich. Das 3,0 Mbp große Chromosom beinhaltet 2834 Gene, von denen 68 % bekannte Funktionen zugewiesen werden konnten. *L. rhamnosus* GG besitzt kein Plasmid wie sein naher Verwandter *L. casei* ATCC 334. Trotz einer hohen Ähnlichkeit der beiden Genome besitzt *L. rhamnosus* GG 755 Gene, die bei *L. casei* ATCC 334 nicht vorhanden sind. *L. rhamnosus* GG besitzt, im Vergleich mit anderen sequenzierten Lactobacillen des Darms, eine große Anzahl an Genen für Proteine, die am Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel beteiligt sind, sowie für Transport- und Abwehrmechanismen zuständig sind. Das Vorkommen von Genen zur Verdauung von Zuckern, für Zelloberflächenproteine, Bakteriozine und eine Hydrolase für Salze der Gallensäure tragen zum Überleben des Bakteriums im Verdauungssystem bei und unterstützen die Interaktionen mit der intestinalen Mucosa und Mikrobiota.

Wie bereits oben erwähnt, bestätigen klinische Studien eine Linderung der Beschwerden bei Neurodermitis durch die Einnahme von *L. rhamnosus* GG (Kalliomäki *et al.*, 2003). Weitere klinische Studien mit *L. rhamnosus* GG belegen die Verminderung von Durchfallerkrankungen, die im Zusammenhang mit Antibiotikabehandlungen auftreten können (Vanderhoof *et al.*, 1999). Auch die Verringerung von Atembeschwerden bei Kindern mit cystischer Fibrose konnte anhand einer klinischen Studie nachgewiesen werden (Bruzzeze *et al.*, 2007). Dies sind nur wenige Beispiele von über 50 klinischen Studien, die mit *L. rhamnosus* GG durchgeführt wurden und einen probiotischen Effekt des Bakteriums nachweisen konnten. Weitere Studien belegen auch einen Einfluss von *L. rhamnosus* GG auf die Entwicklung von Übergewicht bei Kindern. Erhielten die Säuglinge nach der Geburt den probiotischen Stamm, neigten sie deutlich seltener zu Übergewicht als Kinder aus der Kontrollgruppe. Dieser Effekt hielt auch über mehrere Jahre hinweg an (Luoto *et al.*, 2010). Außerdem konnte, ähnlich wie für den unten beschriebenen *L. casei* W56, eine Hinderung der Kolonisierung des Darms mit Vancomycin resistenten Enterococcen festgestellt werden (Szachta *et al.*, 2011). An diesen Beispielen wird deutlich wie unglaublich vielfältig die Auswirkungen verschiedener Mikroorganismen auf den menschlichen Körper sein können.

Als immunologisch negativer Vergleichsstamm diente ***Lactobacillus rhamnosus* W102**. Bei diesem Stamm handelt es sich um ein potentiell probiotisches Bakterium, für das *in vitro* gezeigt wurde, dass es im menschlichen Gastrointestinaltrakt überleben kann (persönliche Mitteilung von Dr. Saskia van Hemert, Winclove Bio Industries).

Der dritte im Fokus dieser Arbeit stehende Stamm ***Lactobacillus casei* W56** besitzt, wie *L. rhamnosus* GG, die Fähigkeit im menschlichen Gastrointestinaltrakt zu überleben

(persönliche Mitteilung von Dr. Saskia van Hemert, Winclone Bio Industries). Er wirkt antimikrobiell gegen pathogene Bakterien der Arten *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Enterococcus faecalis* (Timmerman *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist er in der Lage, die Biofilmbildung bei Vancomycin resistenten Enterococcen zu inhibieren (persönliche Kommunikation mit Dr. Saskia van Hemert, Winclone Bio Industries). Ebenso wie beispielsweise *L. rhamnosus* GG, induziert auch *L. casei* W56 Hitze-Schock-Proteine in der humanen, epithelialen Zelllinie Caco-2. Diese Eigenschaft könnte eine mögliche schützende Auswirkung der probiotischen Bakterien auf den Menschen haben, da sie, neben anderem, für die Herabregulierung der von Salmonellen ausgelösten IL-8 Synthese verantwortlich ist (Malago *et al.*, 2010). Neben diesen Eigenschaften hat *L. casei* W56 auch direkte Auswirkungen auf die Produktion von humanen Interleukinen. So beeinflusst er *in vitro* die humane Immunantwort über die Anregung zur IL-10 Produktion (Niers *et al.*, 2005). IL-10 ist eines der beiden hauptverantwortlichen Cytokine im menschlichen Körper, welche die Minderung von Entzündungsreaktionen steuern. Dies ist nötig um eine Selbstschädigung des Organismus zu unterbinden, wie sie etwa bei einem septischen Schock auftritt (Grütz, 2005). Des Weiteren konnten Lutgendorff *et al.* (2009) in einer Studie an Ratten zeigen, dass eine Behandlung mit einer Mischung aus probiotischen Bakterien, darunter auch *L. casei* W56, die von akuter Pankreatitis verursachten Veränderungen in der Durchlässigkeit der Darmwand, vermindern kann.

Trotz umfangreicher Untersuchungen der Wirkungen dieser beiden probiotischen Stämme, gibt es bisher kaum Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen. Ein entscheidender Punkt ist die auffallende Langlebigkeit von *L. rhamnosus* GG im menschlichen Darm. Diese wird vor allem durch Pili ähnliche Strukturen (Kankainen *et al.*, 2009) und ein für die Mucosa spezifisches Adhesin (MBF - mucus binding factor) (Von Ossowski *et al.*, 2011) unterstützt. Darüber hinaus werden von *L. rhamnosus* GG zwei Proteine sezerniert, die anti-apoptotische und zellschützende Effekte bei Darmepithelzellen auslösen. Diese sogenannten p40 und p75 Proteine, die auch als Msp2 und Msp1 beschrieben wurden, wurden bisher nur in *L. rhamnosus* und *L. casei* bzw. *L. paracasei* gefunden (Bäuerl *et al.*, 2010; Kleerebezem *et al.*, 2010).

Diese Erkenntnisse zeigen, dass neben den klinischen Studien bereits erste Forschungsergebnisse zur Aufklärung der probiotischen Mechanismen existieren. Jedoch fanden diese bisher hauptsächlich auf Proteinebene statt und nicht im Bereich kleiner Moleküle, die von den Bakterien abgegeben werden. Dies sollte das Ziel einer

interdisziplinären Kooperation am Helmholtz Zentrum München sein, in deren Rahmen diese Doktorarbeit entstanden ist.

A.6 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die mikrobiologischen Grundlagen eines der Wirkungsmechanismen probiotischer Bakterien auf das menschliche Immunsystem genauer zu untersuchen. Ein wichtiger Bestandteil dabei sollte die Identifikation eines immunmodulatorisch aktiven Moleküls sein, das von einigen probiotischen Bakterien erzeugt und sezerniert wird. Diese Versuche fanden in sehr enger Kooperation mit Inge Kepert und PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann vom Comprehensive Pneumology Center (CPC) der Ludwig-Maximilians-Universitätsklinik und des Helmholtz Zentrums München, sowie mit Juliano Fonseca und PD Dr. Philippe Schmitt-Kopplin von der Abteilung BioGeoChemie und Analytik am Helmholtz Zentrum München und der Technischen Universität München statt. Die Ergebnisse dieser Kooperation sind in C.2 und G.1 zusammenfassend aufgeführt.

Im Vorfeld zu diesem Teil der Arbeit waren Versuche zum Wachstumsverhalten und zur Auswahl eines geeigneten, definierten Mediums durchgeführt worden, um innerhalb der Kooperation mit Immunologen und Chemikern verschiedene Milchsäurebakterien auf ihre immunmodulatorische Aktivität zu prüfen.

Aus dieser Kooperation ergab sich, dass D-Tryptophan ein potentiell wichtiger Metabolit der probiotischen Wirkung sein kann. Mit Hilfe einer High Performance Liquid Chromatography (HPLC) sollte ein einfaches Nachweissystem für D-Tryptophan entwickelt werden, welches keinen Derivatisierungsschritt benötigt, wie er für das bisherige System mit UPLC nötig war. Die Nachweisgrenze für dieses Nachweissystem sollte in dem Bereich der Konzentrationen liegen, in dem für die aktive Reinsubstanz, Aktivität gemessen werden konnte.

Des Weiteren sollten auch die molekularen Hintergründe des Biosyntheseweges von D-Tryptophan weiter geklärt werden. Dafür sollte das Genom eines geeigneten Produzentenstammes erstellt werden und mit dem Genom eines Stammes verglichen werden, der D-Tryptophan nicht sezerniert. Diese Stämme sollten auch genauer phylogenetisch charakterisiert werden. Für den Vergleich auf Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Ebene sollten die beiden Genome mit der 454-Pyrosequencing-Technik sequenziert und anschließend annotiert werden. Durch diesen Vergleich sollten Gene gefunden werden, die möglicherweise am Biosyntheseweg des zu untersuchenden Moleküls beteiligt sind.

Ferner sollten Grundlagen für die Detailanalyse von Funktionen relevanter Gene durch die gezielte Erstellung von Knock-Out-Mutanten, durch die Optimierung geeigneter

Mutationsprotokolle, entwickelt werden. Die Generierung der Mutanten sollte über homologe Rekombination ablaufen. Dazu war es notwendig, Plasmide mit geeigneten Insertionskassetten und Selektionsfaktoren zusammenzustellen und entsprechende Mutagenese-Protokolle auszuarbeiten.

B MATERIAL UND METHODEN

B.1 Kultivierung der Mikroorganismen

B.1.1 Anzucht der Bakterienstämme

Eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Stämme findet sich in Tabelle B-1. *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. und *Enterococcus* spp. wurden, soweit nicht anders angegeben, unter microaerob/anaeroben Bedingungen bei 37 °C in einem BK 700 Inkubator (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe) angezogen. *Escherichia coli* Zellen wurden unter aeroben Bedingungen bei 30 °C in einem Brutschrank (Innova 4200, New Brunswick Scientific, Edison, USA) kultiviert. Um microaerob/anaeroben Bedingungen zu erhalten, wurden Flüssigkulturen in Röhrchen mit Schraubverschluss (Schott, Mainz) angezogen die vollständig mit Medium gefüllt waren. Nährböden wurden in 2,5 l-Anaerobentöpfen (Oxoid, Basingstoke, England) mit einem AnaeroGenTM-Gasentwickler (Oxoid, Basingstoke, England) inkubiert. Die aeroben *E. coli* wurden während der Inkubation in Flüssigkultur mit 180 rpm geschüttelt (Th15 bzw. KS15, Edmund Bühler, Hechingen).

Tabelle B-1 Verwendete Bakterienstämme

Stamm			Quelle
<i>Lactobacillus</i> spp.			
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	LA2	Chr. Hansen, Horsholm, Denmark
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> DSM 20079		DSMZ
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	W 12	Winclove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	W 22	Winclove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	W 33	Winclove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	W 37	Winclove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	W 50	Winclove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	W 55	Winclove
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	W 74	Winclove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Lc01	Chr. Hansen, Horsholm, Denmark
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM 20312		DSMZ
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	W 7	Winclove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	W 56	Winclove, Amsterdam, The Netherlands

<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	W 79	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	W 20	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	W 21	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	W 53	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	W 62	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i> DSM 20174		DSMZ
<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	W 24	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	W 57	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	W 44	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i> DSM 20077		DSMZ
<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	W 60	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	W 102	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i> GG ATCC 53103	LGG	Valio, Helsinki, Finnland
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i> DSM 20021		DSMZ
Bifidobakterien			
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i> 420 DSM 22089		Danisco, Niebüll
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	W 9	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	W 25	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i> DSM 20091		DSMZ
<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i>	W 23	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i> DSM 20456		DSMZ
<i>Bifidobacterium</i>	<i>lactis</i>	W 51	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Bifidobacterium</i>	<i>lactis</i>	W 52	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	W 108	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB-46	Chr. Hansen, Horsholm, Denmark
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i> DSM 20088		DSMZ
Andere			
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	W 19	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	W 32	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	W 58	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	W 54	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	W 69	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	W 122	Winlove, Amsterdam, The Netherlands
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> Nissle		Ardeypharm, Herdecke
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> Top10		Invitrogen, Darmstadt

B.1.2 Verwendete Medien und Antibiotika

Die erforderlichen Chemikalien für die im Folgenden beschriebenen Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Applichem (Darmstadt) und Merck (Darmstadt) in p.a. Qualität bezogen.

B.1.2.1 Vollmedien

Alle Vollmedien wurden durch Autoklavieren (DX-65, Systec, Wettenberg) bei 121 °C und einem Druck von 2,1 bar für 20 min sterilisiert. Es wurde einfach entionisiertes Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$) aus einem Elix Elektro Entionisierungssystem (Millipore, Darmstadt) verwendet. Für die Herstellung von Nährböden wurden je 15 g Agar (Bernd Euler Biotechnologie, Frankfurt am Main) pro Liter Medium vor dem Autoklavieren zugegeben.

de Man, Rogosa und Sharpe- Medium (MRS)

Für die Anzucht von allen mikroaerophilen Stämmen wurde standardmäßig MRS-Medium (Applichem, Darmstadt) verwendet, jedoch ohne die vom Hersteller empfohlene Zugabe von Tween80 und Natriumacetat. Für die Inokulation von Bifidobakterien wurde dem Medium 5 g/l L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat zugefügt. Cystein wirkt als Reduktionsmittel und erniedrigt das Redoxpotential des Nährbodens.

Luria-Bertani-Medium (LB)

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde LB-Medium verwendet.

Hefeextrakt	5 g
Pepton aus Casein	10 g
NaCl	5 g
ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$	1000 ml

Für die „Blau-Weiß-Selektion“, wie sie in B.2.3.5 angewandt wird, wurde dem autoklavierten Medium, nach Abkühlen auf ca. 45 °C, 40 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) zugegeben.

B.1.2.2 Definiertes Medium für Gram-positive Bakterien

Für Versuche mit anschließender instrumenteller Analytik der Medienbestandteile ist es wichtig die genaue Zusammensetzung des Mediums zu kennen. Daher war die Verwendung eines definierten Mediums notwendig. In dieser Arbeit wurden zwei definierte Medien verwendet: Das chemisch definierte Medium I (CDMI) von Savijoki *et al.* (2006) und DML von Møretrø *et al.*, (1998). Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle B-2, Tabelle B-3 und Tabelle B-4 aufgelistet.

Für Kulturen, deren Überstände später in einer der genannten Methoden analysiert wurden, wurde CDMI verwendet. Der hier als Vitaminlösung benannte Teil wurde bei -20 °C gelagert, wohingegen der Rest des Mediums wöchentlich frisch angesetzt wurde. Das Medium wurde dahingehend modifiziert, dass auf Tween80 verzichtet wurde.

Da durch Erhitzen die Struktur von Proteinen verändert wird, wurde das Medium nicht autoklaviert, sondern steril filtriert. Die Filter bestehen aus Polyethersulfon (PES) mit einer Porengröße von 0,45 µm (Millipore GmbH, Darmstadt). Die Medienbestandteile wurden in entsalztem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q PLUS, Millipore GmbH, Darmstadt) gelöst.

Tabelle B-2 CDMI

	[g/l]	[mmol/l]		[g/l]	[mmol/l]
DL-Alanin	0,5	5,6	L-Tryptophan	0,56	2,7
Bacto Asparagin	1,1	8,3	L-Aspartat	0,8	6,0
L-Cystein	1,5	12,4	L-Tyrosin	0,4	2,2
L-Glutamin	1,0	6,8	L-Threonin	0,5	4,2
Glycin	0,4	5,3	L-Glutamat	1,2	8,2
L-Histidin	0,44	2,8	L-Valin	1,0	8,5
L-Isoleucin	0,5	3,8	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	0,8
L-Leucin	0,5	3,8	Na-Acetat	20	243,8
L-Lysin	1,05	7,2	NH ₄ Cl	3,0	56,1
L-Methionin	0,2	1,3	KH ₂ PO ₄	0,6	4,4
L-Phenylalanin	0,5	3,0	K ₂ HPO ₄	0,6	3,4
L-Prolin	0,4	3,5	D(+) Glucose	25	138,8
L-Serin	1,55	14,7	Vitaminlösung	s. Tabelle B-3	

Tabelle B-3 Vitaminlösung für CDMI. Angabe der Endkonzentrationen in CDMI

	[g/l]	[mmol/l]		[g/l]	[mmol/l]
L-Cystin	0,05	0,208	Folsäure	0,005	0,011
Thiamin	0,005	0,015	Adenin	0,01	0,074
Riboflavin	0,005	0,013	Guanin	0,01	0,066
Nikotinsäure	0,004	0,032	Uracil	0,01	0,089
Ca-Pantothersäure	0,005	0,023	Xanthin	0,01	0,066
Pyridoxin	0,004	0,023	Myo-Inositol	0,005	0,028
Cyanocobalamin	0,005	0,004	MnSO ₄ x H ₂ O	0,01	0,059
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01	0,036	NaCl	0,01	0,171
p-Aminobenzoesäure	0,005	0,036	D(+) Biotin	0,005	0,020

Tabelle B-4 DML

	[g/l]	[mmol/l]		[g/l]	[mmol/l]
DL-Alanin	0,16	1,8	Riboflavin	0,0005	0,001
L-Asparagin	0,4	3,0	Nikotinsäure	0,001	0,008
L-Cystein	0,2	1,7	D-Phantothersäure	0,001	0,005
L-Argingin	0,05	0,3	Thiaminchlorid HCl	0,001	0,003
L-Valin	0,06	0,5	Pyridoxal HCl	0,0005	0,003
L-Glutamin	0,3	2,0	D(+)-Biotin	0,00001	0,00004
Glycin	0,1	1,3	Folsäure	0,0001	0,0002
L-Histidin	0,1	0,6	Adenin	0,025	0,2
L-Isoleucin	0,05	0,4	Uracil	0,025	0,2
L-Leucin	0,06	0,5	Xanthin	0,025	0,2
L-Lysin	0,1	0,7	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,15	0,6
L-Methionin	0,025	0,2	Na-Acetat	20	243,8
L-Phenylalanin	0,04	0,2	NH ₄ Cl	3	56,1
L-Prolin	0,04	0,4	KH ₂ PO ₄	1	7,3
L-Serin	0,08	0,8	Tween80	0,55	0,4
L-Threonin	0,05	0,4	D(+) Glucose	10	55,5
L-Tryptophan	0,1	0,5	Bersteinsäure	11,9	100,8
L-Tyrosin	0,04	0,4			

B.1.2.3 Eingesetzte Antibiotika

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. In Tabelle B-5 sind die verwendeten Endkonzentrationen sowie das jeweilige Lösungsmittel für die 1000-fach konzentrierte Stammlösung aufgelistet. Diese wurden steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Flüssigmedien wurden direkt vor der Inokulation mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt. Für Agarplatten wurden die Antibiotika dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C zugegeben, bevor dieses gegossen wurde. Platten, die Antibiotika enthalten, wurden für max. zwei Monate lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tabelle B-5 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin (Ap)	100 µg/ml	50 % Ethanol
Chloramphenicol	10 µg/ml	Ethanol
Erythromycin (Ery)	10 µg/ml	Ethanol
Gentamycin	20 µg/ml	H ₂ O
Kanamycin (Km)	50 µg/ml	H ₂ O
Tetracyclin (Tc)	20 µg/ml	50 % Ethanol

B.1.3 Ernte zellfreier Überstände

Die Ernte zellfreier Überstände erfolgte durch Zentrifugation von bewachsenem Medium bei 5000 g (Universal 32R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Der Überstand wurde anschließend durch einen PES-Filter mit 0,22 µm Porengröße (Millipore, Darmstadt) gefiltert, das Zellpellet wurde verworfen. Die Überstände wurden bei -20 °C bzw. -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

B.1.4 Photometrische Bestimmung der Zelldichte und Erstellen von Wachstumskurven

Zum Erstellen von Wachstumskurven, wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Photometer CE 3021 (Cecil Instruments Ltd, Cambridge, England) gemessen. Mit Hilfe dieser könnte später eine Einordnung der gewachsenen Kulturen in die

jeweilige Wachstumsphase durchgeführt werden. Als Null-Referenz wurde das jeweilige sterile Medium verwendet.

Durch mehrere Messungen in definiertem Zeitabstand (abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien zwischen ein und vier Stunden) lässt sich die Abhängigkeit der Zelldichte von der Zeit ermitteln.

B.1.5 Biochemische Identifizierung der Bakterienstämme mit Hilfe eines API-Testsystems

Die API-Tests der Firma bioMérieux® sa (Marcy-l'etoile, France) können zu einer groben phylogenetischen Einteilung auf Grundlage des Kohlenhydratstoffwechsels genützt werden. Der API 50 CH soll laut Hersteller in Kombination mit dem Medium API 50 CHL speziell zur Identifizierung von Lactobacillen und verwandten Gattungen geeignet sein. Dieser Test besteht aus 50 Mikroröhrchen in einem Teststreifen, die verschiedene Substrate und den Indikator Bromkresolpurpur enthalten. Können die Bakterien das angebotene Substrat verstoffwechseln findet durch die gebildete Säure eine Änderung des pH-Wertes statt und der Indikator wechselt von violett zu gelb. Anhand einer Prozenttabelle können die Mikroorganismen dann eingeteilt werden.

Die Durchführung erfolgte nach der dem Test beiliegenden Anleitung. Dabei werden die zu testenden Bakterien in API 50 CHL Medium resuspendiert, in alle Röhrchen überimpft und mit Parafinöl überschichtet. Die Auswertung erfolgt nach 48 h Inkubation bei 37 °C.

B.2 Molekularbiologische Methoden

B.2.1 Verwendete Plasmide

Die in dieser Arbeit für die Generierung der Knock-Out-Mutante von *L. casei* W56 verwendeten Plasmide sind in Tabelle B-6 aufgelistet. Diese beinhaltet auch ihre Herkunft, sowie besondere relevante Eigenschaften und die im Weiteren verwendete Abkürzung.

Tabelle B-6 Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften*	Referenz
pSC-A-Ap/Km (pSCA)	Ap+Km Resistenz; <i>lacZα</i>	Agilent, Santa Clara, USA
pCR® 2.1-TOPO®	Ap+Km Resistenz; TA-Klonierung; <i>lacZα</i>	Invitrogen, Darmstadt
pGhost9 (pGh9)	Ery Resistenz; temperatursensitiv durch <i>repA</i>	Dr. Maguin, INRA, France (Maguin <i>et al.</i> , 1992)
pEX18Ap	Ap Resistenz; Suizidvektor <i>sacB</i> ⁺	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pEX18Ap-trpC-Tn5	pEX18Ap mit <i>trpC</i> Homologem; Tc Resistenz	diese Arbeit
pGh9-trpC-Tn5	pGh9 mit <i>trpC</i> Homologem; Tc Resistenz	diese Arbeit
pSCA-trpC	pGh9 mit <i>trpC</i> Homologem	diese Arbeit
pSCA trpC Tn5	pSCA-trpC mit Tc Resistenz	diese Arbeit

* Erläuterungen zu den relevanten Eigenschaften der Plasmide:

<i>lacZα</i>	Codiert für das Enzym β-Galaktosidase, entscheidendes Enzym für die „Blau-Weiß-Selektion“ (B.2.3.5)
<i>repA</i>	Thermosensitiver Replikationsursprung, der zur Folge hat, dass das Plasmid bei erhöhter Temperatur nicht mehr repliziert wird.
<i>sacB</i>	Die Expression von <i>sacB</i> wirkt in Gegenwart von Sucrose letal.

B.2.2 DNS-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

B.2.2.1 DNS-Isolierung aus Reinkultur

DNS aus Reinkulturen wurde mit Hilfe des FastDNA SPIN Kits for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornien, USA) gewonnen. Der Zellaufschluss erfolgte in diesem Kit mechanisch mit Hilfe eines FastPrep Homogenisators (FP120, Thermo Savant, Schwerte) und der LyseMatrix E (1,4 mm Keramikugeln, 0,1 mm Silicakugeln und eine 4 mm Glaskugel) für 40 s bei 6,0 m/s. Als Elutionspuffer wurde Nuklease-freies Wasser (Qiagen, Hilden) oder TE-Puffer (im Kit enthalten) verwendet.

B.2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Standardmäßig wurde die Konzentration und Reinheit der DNS mit einem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) über Messungen der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Die Berechnung der Konzentrationen beruht auf dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren bei 260 nm und wird mit der zugehörigen Software ND-1000 (Version 3.3.0) durchgeführt. Es wurden jeweils 2 µl der zu bestimmenden Probe aufgetragen.

Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht etwa einer DNS-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 2001), der Absorptionskoeffizient von 260 nm/280 nm liefert Informationen über die Reinheit der DNS, da bei 280 nm die meisten Proteine ihr Absorptionsmaximum haben. Für DNS sollte daher der Wert des Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

B.2.2.3 Konzentrationsbestimmung mit PicoGreen

Wurde die DNS anschließend zur Erstellung einer *Rapid Library* für die 454-Pyrosequenzierung verwendet, wurde zur Konzentrationsbestimmung ein Verfahren mit *PicoGreen* (Quent-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Invitrogen™, Eugene, USA) genutzt. Diese Methode ist genauer als die photometrische Bestimmung, da nur doppelsträngige DNS gemessen wird. Bei der photometrischen Bestimmung können durch Nucleotide oder einzelsträngige DNS-Stücke Messungenauigkeiten entstehen.

Parallel zu den zu messenden Proben muss eine Standardgerade von der im Kit enthaltenen Kontroll-DNS in 1:2-Verdünnungen von 0,78 bis 50 ng/µl in TE-Puffer (Invitrogen, Paisley, UK) angefertigt werden. In einer schwarzen FluoroNunc™ F96 MicroWell™ Platte (Nunc, Roskilde, Denmark) wurden 250 µl einer 200-fachen PicoGreen Verdünnung mit je 1 µl Probe bzw. Standard gemischt und mit einem Spectramax Gemini EM Fluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 480 nm, die Emission wurde bei 520 nm gemessen.

B.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

B.2.3.1 Primerdesign

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins (Ebersberg) synthetisiert und sofern sie speziell für diese Arbeit entwickelt wurden, mit Hilfe des Programms Oligo Explorer™,

Version 1.1.0 (©Teemu Kuulasmaa, Kuopio, Finland) designed. Die Schmelztemperatur T_m wurde so gewählt, dass sie zwischen 55 und 63 °C lag. Einigen Primern wurde zusätzlich eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym, sowie drei zusätzliche Basen am 5'-Ende angehängt, um einen gezielten Verdau anzuschließen (B.2.5.1). Eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer, sowie deren Sequenzen, findet sich in Tabelle B-7. Sofern sie im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, wurden sie vorab mit Hilfe der vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) bereitgestellten Software BLAST (Altschul *et al.*, 1990) auf ihre Spezifität geprüft. Die Primer wurden lyophilisiert bezogen und in Nuclease-freiem Wasser (Qiagen, Hilden) in einer Konzentration von 50 pmol/µl rekonstituiert, anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle B-7 Verwendete Primer

Name	Sequenz	Schnittstelle	Herkunft
Schließen der Lücken im Genom			
W56 C1-2 F	5' - TGA GAC TGT CAG CCA TAA GCG -3'		diese Arbeit
W56 C1-2 R	5' - CGG ACA CGA TTG TAA ACG AAG -3'		diese Arbeit
W56 C2-1 F	5' - ATA ATC GGC GTG TAT TGG C -3'		diese Arbeit
W56 C2-1 R	5' - CGG GTT TTG CTG TCT GTA TC -3'		diese Arbeit
Schließen der Lücken im Plasmid			
W56 P C1-2 F	5' - AAT TGC CGG GTT CCT AAG TC -3'		diese Arbeit
W56 P C1-2 R	5' - GTC GCT TCC TAT CGT TTT GC -3'		diese Arbeit
W56 P C2-1 F	5' - ATG ACC GTG GTG TGA TGA A -3'		diese Arbeit
W56 P C2-1 R	5' - AAC ATG TGA GTG GCT AAG TGC -3'		diese Arbeit
W56 P 1-2b F	5' - TGA CCT TCA CGA CAA ACA CG -3'		diese Arbeit
W56 P 2b R	5' - TTT CCA GGC ACA ACA GTT AGC -3'		diese Arbeit
W56 P 2c R	5' - GGC ATT CCA AAG ATT GAC G -3'		diese Arbeit
Auffinden der Transposons			
W56 Transp- F	5' - CGA GTG TTC ACC AAG TCA AG -3'		diese Arbeit
W56 T1 F	5' - CTT CAA CTC GGC TTC ATC AG -3'		diese Arbeit
W56 T1 R	5' - CCG CGA TAT TGT TTA TCC C -3'		diese Arbeit
W56 T2 F	5' - GAT CCG TTC GCA TTG TAG G -3'		diese Arbeit
W56 T2 R	5' - CCG TCA ACG TTC AAG AAG C -3'		diese Arbeit

W56 T3 F	5'- CAG AAG CGG ATG GAC TAT GC -3'	diese Arbeit
W56 T3 R	5'- AGT GCC GCT TTG TGG AAT G -3'	diese Arbeit
W56 T4 F	5'- CGC TAC GAA ATG AAA ACG G -3'	diese Arbeit
W56 T4 R	5'- GGC GAT CTG TCT GTG CTT AG -3'	diese Arbeit
W56 T5 F	5'- CCA AGG TTG TCG CAA GTA CG -3'	diese Arbeit
W56 T5 R	5'- GCC GCT TTT TCA TCA AAC TG -3'	diese Arbeit

Erstellen der Knock-Out-Mutante

pGh9 01 F	5'- CCA GTG AGC GCG CGT AAT ACG -3'	(Fontaine <i>et al.</i> , 2003)
pGh9 02 R	5'- GGT ATA CTA CTG ACA GCT TCC -3'	(Fontaine <i>et al.</i> , 2003)
W56trpC Sall-F	5'- AAA <u>GTC GAC</u> AAG CCG GAT TTT CTA ACA CG -3'	Sall diese Arbeit
W56trpC Sall-R	5'- AAA <u>GTC GAC</u> AAC GAC GGG GAT GTT GTC -3'	Sall diese Arbeit
W56trpC XhoI-F	5'- AAA <u>CTC GAG</u> AAA GCC GGA TTT TCT AAC ACG -3'	XhoI diese Arbeit
W56trpC XhoI-R	5'- AAA <u>CTC GAG</u> AAC GAC GGG GAT GTT GTC -3'	XhoI diese Arbeit
T3	5'- ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA -3'	Sequierserve
T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'	Sequierserve
Tet-1FP-1	5'- GGG TGC GCA TGA TCC TCT AGA GT -3'	Epicentre®
Tet-1RP-1	5'- TAA ATT GCA CTG AAA TCT AGA AAT A -3'	Epicentre®
M13 F	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AG -3'	Sequierserve
M13 R	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'	Sequierserve

B.2.3.2 Standard-PCR

Für die Amplifikation von PCR-Fragmenten standen einfach programmierbare Thermocycler (Primus 96 advanced und PeqSTAR, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) zur Verfügung. Soweit nicht anders angegeben, wurden Ansätze mit 25 µl oder 50 µl Gesamtvolumen pipettiert. Alle Reagenzien wurden aus dem TopTaq® DNA Polymerase Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Folgt der PCR weitere enzymatische Schritte, wurde der CoralLoad-Puffer durch Nuklease freies H₂O ersetzt. Für die 25 µl Ansätze wurden die unten angegebenen Mengen aller Reagenzien halbiert.

Reaktionsansatz		Programm			
10x Reaktionspuffer	5,0 µl	30x {	Startdenaturierung	5 min	94 °C
Coral Load	5,0 µl		Denaturierung	1 min	94 °C
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl		Annealing	1 min	x °C
Primer R (50 pmol/µl)	0,2 µl		Elongation	30 s	72 °C
Primer F (50 pmol/µl)	0,2 µl		Finale Elongation	10 min	72 °C
H ₂ O _{nukleasefrei}	37,35 µl				
DNS-Template	1,0 µl				
<u>Taq-Polymerase</u>	<u>0,25 µl</u>				
Gesamtvolumen:	50,0 µl				

Je nach Länge des zu amplifizierenden DNS-Fragments wurde die Elongationszeit bis auf 45 s verlängert. Die Temperatur x im Annealingschritt war abhängig vom jeweils verwendeten Primerpaar. Für die Kolonie-PCR wurden anstatt der gelösten DNS, frische Zellen einer gut gewachsenen Kolonie zugegeben.

B.2.3.3 Aufreinigung der Produkte und Auftrennung über Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR-Amplifikation wurde für die Fragmentlängenanalyse der erhaltenen Fragmente eine Gelelektrophorese durchgeführt. Das Anfärben der DNS erfolgte mittels 3 % Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) das bereits vor dem Gießen des Gels zugegeben wurde. Standardmäßig wurden 1 %ige Agarosegele (Biozym DNA Agarose, Hessisch Oldendorf) verwendet an die eine Spannung von 120 V bis zur gewünschten Auftrennung angelegt wurde. Bei kleinen PCR-Produkten wurden 2 %ige Agarosegele verwendet, um einen höheren Grad der Auftrennung zu erzielen. Zur Abschätzung der Sequenzlänge wurden die 100 bp oder 1 kb Längenstandards GeneRuler™ DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) eingesetzt. Sofern weitere Bearbeitungsschritte folgten, wurden die PCR-Amplifikate mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit“ von MACHEREY- NAGEL (Düren) gereinigt. Dieses Kit wurde auch zum Ausschneiden und Reinigen von DNS-Banden aus Gelen verwendet.

B.2.3.4 Vorbereitung der „DNA-Library“ und anschließende Emulsion PCR (emPCR)

Für die 454-Sequenzierung mit dem Roche GS FLX Titanium System (Penzberg), ist zur Amplifizierung eine speziell dafür entwickelte Emulsion PCR (emPCR) nötig, inklusive der zugehörigen Probenvorbereitung.

Die Vorbereitung der „DNA-Library“ wurde nach dem von Roche gestellten „Rapid Library Preparation Method Manual“ durchgeführt. Es wurden 501 ng (*L. rhamnosus* W102) bzw. 628 ng (*L. casei* W56) genomische DNS in die Fragmentierung zu Beginn des Protokolls eingesetzt. Dabei werden mit Hilfe eines „Nebulizers“ kleine DNS Fragmente erzeugt. Dies geschieht unter einem N₂-Druck von 30 psi für eine Minute. Anschließend werden diese mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt, Adaptoren an die Enden geknüpft und diese dann mit magnetischen „AMPure Beads“ verbunden, um sehr kleine Fragmente mit Hilfe eines Magneten abzutrennen. Abschließend werden die DNS-Stücke wieder von den Beads getrennt. Die Konzentration der so erhaltenen Library wird mit einem Quantifluor™ ST Fluorometer (Promega, Madison, USA) und einer Anregungswellenlänge von 460 nm gemessen und anhand eines Standards quantifiziert. Der angeregte Fluorophor ist an die Adaptoren geknüpft. Die Qualität der Library wurde mit dem Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA Chip hinsichtlich ihrer Längenverteilung überprüft. Die mittlere Fragmentlänge der Library sollte zwischen 600 und 900 bp liegen und weniger als 10 % sollten kleiner als 350 bp sein.

Direkt vor der anschließenden emPCR mit dem Lib-L SV-Kit von Roche wurden die DNS-Stränge durch Hitze denaturiert. Die Arbeitslösung der zuvor bereiteten „Library“ hat eine Konzentration von 1×10^7 Moleküle/ μ l und wird nun auf $2,4 \times 10^6$ Moleküle/ μ l mit TE-Puffer (Invitrogen, Paisley, UK) verdünnt. Davon wurden 0,5 bis 4 μ l in die emPCR eingesetzt. Die Menge ist dabei abhängig von der Ausbeute an angereicherten Beads am Ende der DNS-Vorbereitung. Entscheidend für das Gelingen der Sequenzierung ist die Titrierung des optimalen Verhältnisses von DNS-Molekülen zu Beads. Laut Herstellerangaben muss es zwischen 5 und 20 % liegen, die besten Ergebnisse erhält man bei 8 %. Es wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ angereicherte Beads} = \frac{\text{Zahl der angereicherten Beads}}{2,4 \times 10^6 (\text{Anzahl eingesetzter Beads})} \times 100$$

Die für das optimale Verhältnis von DNS-Molekülen zu Beads einzusetzende DNS-Menge wurde durch Titration mit verschiedenen DNS-Mengen ermittelt.

Bei der emPCR werden die einzelnen Beads mit ihrem gebundenen DNS-Strang in kleine Öl-Emulsions-Tröpfchen eingeschlossen und bilden so einen eigenen Reaktionsbereich. In der PCR-Reaktion selbst wird dann dieses DNS-Fragment an seinem Bead gebunden amplifiziert (Abb. B.1). Diesem Schritt folgt das „Emulsion Breaking“ bei dem die Öl-Kügelchen wieder gelöst werden und schließlich die eigentliche Sequenzierung abläuft (B.2.4.2).

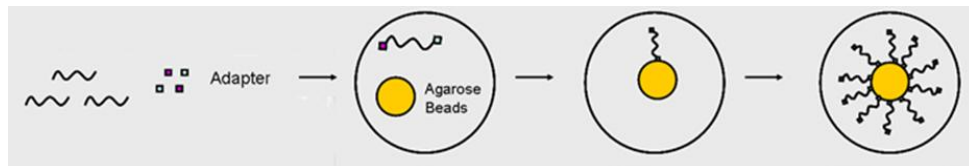


Abb. B.1 Schematische Darstellung der emPCR Amplifizierung
 Quelle: "<http://grf.lshtm.ac.uk/sequencing.htm>"

B.2.3.5 Klonierung von PCR-Produkten in chemisch kompetente *E. coli* Zellen

Mit dem StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent, Böblingen) können PCR Fragmente in den pSC-A-Ap/Km Vektor ligiert werden. Dies wurde sowohl für den ersten Schritt in der Konstruktion der Insertionskassette, als auch für anschließende Sequenzierungen verwendet. Die Selektion der Klone, die das PCR-Produkt eingebaut haben, erfolgte über „Blau-Weiß-Selektion“ und anschließende Überprüfung mit Kolonie-PCR. Dies wurde sowohl für die Vermehrung und Konservierung einzelner DNS-Stücke, als auch zum Vermeiden von Mischsequenzen in nachfolgenden Sequenzierreaktionen verwendet. Das Kit verwendet das Prinzip der TA-Klonierung kombiniert mit einer Topoisomeraseaktivität. So ist kein zusätzlicher Ligationsschritt oder das Anhängen spezifischer Überhänge während der PCR nötig. Aufgrund ihrer terminalen Transferaseaktivität hängt die *Taq*-Polymerase während der PCR unspezifisch Adenin (A)-Überhänge an die Enden des Amplifikats (Clark & Pazdernik, 2009). Das Plasmid, das im Kit enthalten ist, enthält Thymin (T)-Überhänge die mit den Überhängen des PCR-Produkts von der Topoisomerase ligiert werden.

Die „Blau-Weiß-Selektion“ macht sich den Abbau von x-Gal, durch β -Galaktosidase zu einem blauen Indigoderivat, zunutze. Die Multiple Cloning Site des Vektors enthält das für die β -Galaktosidase kodierende Gen *lacZ*. Durch Einbau des PCR-Fragmentes wird diese unterbrochen. Daher erscheinen Zellen die das Insert aufgenommen haben weiß, die übrigen blau (Fritsche, 1999).

B.2.4 Sequenzierung

B.2.4.1 Vorbereitungen für Sanger DNS-Sequenzierung

Für die Überprüfung der Identität der Bakterien wurden die 16S-rDNS Gene ausgewählter Kulturen mit der Methode nach Sanger sequenziert. Ebenso wurden PCR-Produkte direkt sequenziert, sofern die Bestimmung der genauen Sequenz nötig war. Die Sequenzierung wurde dann von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) oder vom Genom Analysis Center (GAC) des Helmholtz Zentrums München durchgeführt.

Bei der Sequenzierung der 16S-rDNS wurden, um die gesamte Länge des Gens zu überspannen, die universalen Primer 608-V, 612-RII, 27-F und 1492-R verwendet. In Tabelle B-8 sind die zugehörigen Sequenzen, Bindungspositionen und Referenzen der Primer angegeben.

Tabelle B-8 Verwendete Primer zur Sequenzierung der 16S-rDNS

Name	5'-3' Sequenz	Bindungsposition	Referenz
in 16S-rDNS von LGG (Morita <i>et al.</i> , 2009)			
608-V	CCG CAC AAG CGG TGG	950 – 964	(Stoffels, 1998)
612-RII	GTA AGG TTY TNC GCG T	988 - 1003	(Stoffels, 1998)
27-F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1 – 20	(Lane, 1991)
1492-R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	1514 - 1534	(Lane, 1991)

Sofern die Sequenzierung intern bearbeitet wurde, war als Vorbereitung für die eigentliche Sequenzierung eine „Sequenzier-PCR“ mit dem BigDye Terminator (BDT) Sequenzierkit (Applied Biosystems GmbH) nötig. Hierfür wurden 70 - 200 ng DNS pro Reaktion eingesetzt. Für jeden Primer ist jeweils ein eigener Ansatz nötig:

Reaktionsansatz		Programm		
BDT Puffer	1,0 µl	Ramp	96 °C	1 °C/s
Primer (50 pmol/µl)	0,2 µl	Temperaturschritt	1 min	96 °C
DNS	xx µl	50x {	Ramp	96 °C
Big Dye Terminator	1,0 µl		Temperaturschritt	10 s
H ₂ O	yy µl		Ramp	50 °C
Gesamtvolumen:	5,0 µl		Temperaturschritt	10 s
			Ramp	60 °C
			Temperaturschritt	4 min

Die anschließende Aufreinigung erfolgte durch Ethanolfällung. Zu je 5 µl Sequenzierreaktion wurden 25 µl 100 % Ethanol pipettiert und 10 Minuten bei -20 °C inkubiert. Dann 15 Minuten bei 4 °C und 2000 g zentrifugiert (4K15C, Sigma, Taufkirchen) und durch Ausklopfen getrocknet. Anschließend wurden 125 µl 70 % Ethanol zugegeben, unter denselben Bedingungen zentrifugiert und getrocknet. Zur vollständigen Trocknung wurde die 96-well-Platte zusätzlich mit den Öffnungen nach außen für eine Minute bei 500 g zentrifugiert. Alle Proben wurden am Ende in je 50 µl LiChrosolv Wasser (Merck, Darmstadt) gelöst und in eine FrameStar® 96-Microtiterplatte (4titude Ltd., Wotton, United Kingdom) überführt. Diese blieb bis zur Sequenzierung durch das GAC bei 4 °C für max. 24 h gelagert. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen ist unter B.5.1 beschrieben.

B.2.4.2 454-Pyrosequenzierung

Für jedes Genom wurde ein Viertel einer PicoTiterPlatte (Roche, Penzberg) verwendet. Damit erhält man laut Hersteller 60-110 Mbp, was dem 20- bis 35-fachen eines durchschnittlichen Lactobacillengenoms entspricht. Die weitere Durchführung hielt sich streng an das Sequencing Method Manual (Roche, Penzberg) vom Oktober 2009 (Rev. November 2010). Bei der 454-Pyrosequenzierungs-Technik wird in jede Vertiefung der PicoTiterPlatte eines der mit DNS bestückten Beads (B.2.3.4) geladen. Nach Einbau eines passenden Nukleotids durch eine DNS-Polymerase wird über eine Enzymkaskade Licht aus Pyrophosphat (PP_i) erzeugt (Ronaghi *et al.*, 1996). Die Anzahl der erzeugten Lichtsignale ist zu der Anzahl der eingebauten Nukleotide proportional. Die Detektion erfolgt über eine im Sequenziergerät enthaltene CCD (Charge-coupled Device)-Kamera.

B.2.5 Enzymatische Modifikation von DNS

B.2.5.1 Restriktionsverdau

Um spezifische „klebrige“ Enden für die Ligation zu erhalten, wurden die Restriktionsendonukleasen *Sall* und *XhoI* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die jeweilige Erkennungssequenz, sowie geeignete Reaktionspuffer und Inkubationsbedingungen, wurden nach Herstellerangaben gewählt.

In die Reaktion wurden 2 bis 20 µl an PCR-Produkt oder Plasmid eingesetzt. Dazu wurde 1 µl Enzym (\triangleq 10 U), 1/10 des Gesamtvolumens an 10-fach Puffer und das entsprechende Volumen an Nuclease- freiem Wasser (Qiagen, Hilden) pipettiert. Das Volumen des Wassers richtet sich nach dem gewünschten Gesamtvolumen. Die Inkubationsdauer betrug 5 bis 16 h bei der für das Enzym optimalen Reaktionstemperatur. Anschließend folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65 °C im Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel).

Die Schnittstellen innerhalb der bekannten Sequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager 5.02 (Scientific & Educational Software, Cary, USA) ermittelt bzw. durch modifizierte Primer (Tabelle B-7) während der PCR angefügt.

B.2.5.2 Dephosphorilierung

Damit geschnittene Plasmide während der Ligation nicht religieren, müssen die durch den Restriktionsverdau (B.2.5.1) erhaltenen Schnittstellen dephosphoriliert werden. Hierfür wurden 0,5 U Calf Intestine Phosphatase (New England Biolabs, Ipswich, England) pro µg Plasmid-DNS mit 10-fach Puffer gemischt und für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Darauf folgte eine standardmäßige Aufreinigung mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit“ von Macherey und Nagel (Düren), wie sie auch für PCR-Produkte verwendet wurde (vgl. B.2.3.3).

B.2.5.3 Ligation

In die Ligation wurde trotz der Dephosphorylierung ein dreifacher Überschuss an Insert vorgelegt, um die Wahrscheinlichkeit eines Einbaus des Inserts in den Vektor zu erhöhen. Die Menge an DNS berechnet sich nach folgender Formel:

$$Xng_{Insert} = \left(\frac{ng_{Vektor} \times bp_{Insert}}{bp_{Vektor}} \right) \times 3$$

Das Gesamtvolumen wurde meist mit 20 µl festgelegt, dieses beinhaltet 2 µl Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (Applchem, Darmstadt). Der Rest setzt sich aus der errechneten Menge an Plasmid, Insert und Nuklease- freiem Wasser (Qiagen, Hilden) zusammen. Die Inkubation dauerte 14 bis 16 h bei 15 °C (BK 700 Inkubator, Thermo Electron Corporation, Karlsruhe). Durch Erhitzen des Plasmids für 5 min auf 94 °C vor Zugabe der anderen Reaktionskomponenten kann die Ligationseffizienz erhöht werden. Zur Vermehrung und dauerhaften Erhaltung wurde das generierte Plasmid anschließend in *E. coli* TOP10 kloniert. Hierfür wurden One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* von Invitrogen™ (Darmstadt) verwendet. Die vorhergehenden theoretischen Planungen wurden wiederum mit dem Programm Clone Manager 5.02 (Scientific & Educational Software, Cary, USA) durchgeführt.

B.2.6 Insertion eines Tetracyclinresistenz-Gens mit Hilfe des Transposons (Tn) 5

Für die Insertion der Tetracyclin (Tc)-Resistenz in das Plasmid pSCA-trpC, wurde das EZ-Tn5™ <TET-1> Insertion Kit (Epicentre, Madison, USA) verwendet. Das Gen für die Tc-Resistenz liegt in diesem Kit innerhalb eines Transposons vor und wird von Mosaiksequenzen (ME) flankiert. Mit Hilfe des Enzyms Transposase wird das Gen dann an einer zufälligen Stelle in die Plasmid-DNS integriert (Abb. B.2) und anschließend in *E. coli* TOP10 transformiert (wie für B.2.5.3). Die Klone wurden durch Ausplattieren auf Nährbodenplatten mit 20 µg/ml Tc selektiert, da nur Kolonien wachsen können, die das Plasmid mit dem integrierten Transposon tragen. Anschließend wurden 50 Kolonien mit Hilfe von PCR dahingehend geprüft, ob sie das Transposon innerhalb des gewünschten Sequenzbereichs tragen. Aus den Kolonien, auf die diese Eigenschaft zutraf, wurden dann die Plasmide isoliert und mit Sanger-Sequenzierung (vgl. B.2.4.1) die genaue Lage des Resistenzgens bestimmt. Die bioinformatischen Methoden, die hierfür nötig waren sind unter B.5.1 aufgeführt.

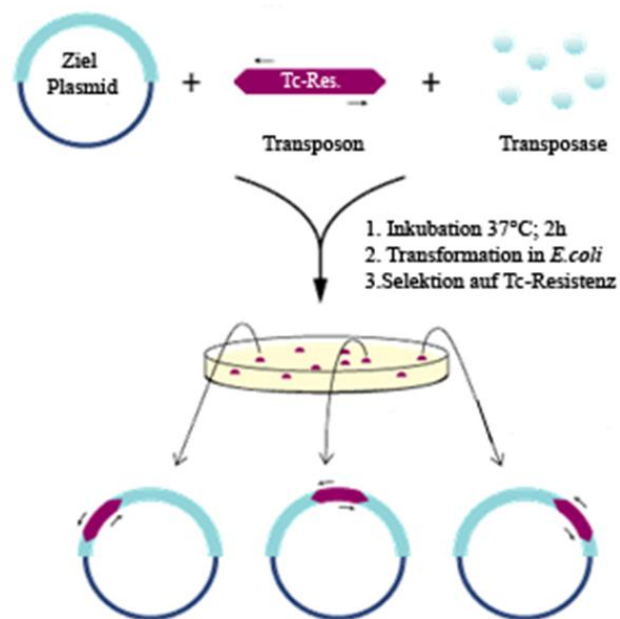


Abb. B.2 Schematische Darstellung des Einbaus einer Tetracyclinresistenz mit Hilfe eines Transposons. Quelle: Hersteller Manual „EZ-Tn5TM <TET-1> Insertion Kit“

B.2.7 Elektrotransformation

B.2.7.1 Herstellung elektrokompenter *L. casei* W56 Zellen

Die Herstellung elektrokompenter *L. casei* W56 Zellen wurde modifiziert nach dem Protokoll von Aukrust und Blom (1992) durchgeführt. 5 ml MRS mit 1 % (w/v) Glycerin wurden mit einer Übernachtskultur von *L. casei* W56 inokuliert, wobei die OD₆₀₀ zu Beginn 0,15 bis 0,2 betrug. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C ohne Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6. Nach der Zellernte (5000x g, 1-2 min, Sigma 1-15, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden diese je einmal mit 1 mM MgCl₂ bzw. 10 % (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 8000 gewaschen. Dies ist eine Modifizierung zum Original-Protokoll bei dem PEG 1500 verwendet wurde. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 50 µl 10 % (w/v) PEG 8000 resuspendiert. Bis zur direkt anschließenden Elektroporation wurden die Zellen auf Eis gelagert.

B.2.7.2 Transformation elektrokompenter *L. casei* W56 Zellen

Für die Elektrotransformation wurde die im Folgenden beschriebene Methode verwendet (aus Hug, 2009). Die Transformation erfolgte nach Zugabe von 50 µl elektrokompenter Zellen zu

5 µl Plasmid in einer gekühlten 0,2 cm Elektroporations-Küvette (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Die Elektroporation wurde mit einem MicroPulserTM (Bio- Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt, die Impulsspannung betrug 1,5 kV, die Impulsdauer 5-6 ms (Programm Sc2). Sofort nach Impulsgabe wurden 500 µl MRS-Medium mit 1 % (w/v) Glycerin und 20 mM MgCl₂ zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei 30 °C wurden 50 bzw. 200 µl des Ansatzes auf MRS-Agarplatten mit Antibiotika ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

B.3 Bestimmung der Temperatursensitivität von pGh9 in *L. casei* W56

Eines der Selektionskriterien (B.4.1) während der Generierung der Knock-Out-Mutante mit pGh9 beinhaltet, dass pGh9 bei höheren Inkubationstemperaturen nicht weiterrepliziert wird und damit nicht an die Tochterzellen weitergegeben wird. Dieser „Verlust“ des temperatursensitiven Plasmids kann nach einer Methode von Maguin *et al.* (1992) überprüft werden. Von einer Übernachtskultur von transformierten *L. casei* W56, die das Plasmid aufgenommen hatten und die in Medium mit Ery gewachsen war, wurden 50 µl in frisches Medium ohne Antibiotika überführt und bei zwei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Als niedrigere Temperatur wurden 30 °C gewählt - bei dieser Temperatur repliziert das Plasmid. Die zweite Temperatur musste experimentell ermittelt werden (C.5.2). Sie entspricht der maximalen Wachstumstemperatur von *L. casei* W56. Nach 0, 8, 16 und 20 h Inkubationszeit wurden von den Kulturen Proben auf Agarplatten ohne Antibiotika ausplattiert. Nachdem die Zellen gewachsen waren, wurden zwischen 10 und 28 Kolonien abgenommen und auf Agarplatten mit Ery überimpft. Das Verhältnis der Ery-resistenten Kolonien zur Gesamtzahl der überimpften Klone ist ein Maß für den Verlust von pGh9.

Dieser „Verlust“ des Plasmids über mehrere Generationen, soll im Verlauf der homologen Rekombination mit pGh9-trpC-Tn5 zur Selektion genutzt werden. Damit können diejenigen Transformanten, die das Plasmid durch das erste homologe Rekombinationsereignis in ihr Chromosom integriert haben, von denjenigen unterschieden werden, die das Plasmid lediglich aufgenommen haben. Denn durch Wachstum bei der höheren Temperatur wird das Plasmid, laut Literaturangaben (Maguin *et al.*, 1992), nicht mehr repliziert und dadurch geht auch die Ery-Resistenz in Tochterzellen „verloren“. Wurde das Plasmid bereits ins Chromosom integriert, bleibt die Resistenz auch bei höheren Inkubationstemperaturen erhalten (vgl.B.4.1).

B.4 Grundlagen zur homologen Rekombination

Nachdem die Plasmide über Elektroporation in die Zellen gebracht wurden (B.2.7), soll dort der Austausch des Zielgens mit der Insertionskassette über homologe Rekombination erfolgen. Diese findet an homologen DNS-Sequenzen statt und erfordert für den kompletten Austausch einer Zielsequenz zwei aufeinanderfolgende Rekombinationsereignisse. Die verwendeten Plasmide müssen verschiedene Selektionsmerkmale enthalten, um Zellen zu identifizieren, bei denen homologe Rekombinationsereignisse stattgefunden haben. Diese werden in den nächsten beiden Abschnitten getrennt für die beiden verwendeten Vektoren erklärt.

B.4.1 Vorgehensweise für das Plasmid pGh9

Das erste Selektionskriterium ist eine Antibiotikaresistenz die auf dem Plasmid, jedoch außerhalb der Insertionskassette enthalten ist. Diese zeigt, ob das Plasmid von der Zelle während der Transformation aufgenommen wurde, da sie dadurch eine Resistenz gegen das Antibiotikum entwickelt. Bei pGh9 handelt es sich hier um eine Ery-Resistenz. Im nächsten Schritt werden Zellen herausgesucht, bei denen das erste homologe Rekombinationsereignis bereits stattgefunden hat und damit das Plasmid in das Genom integriert wurde. Hierfür sorgt bei pGh9 der thermosensitive Replikationsursprung *repA*. Das Plasmid wird bei höheren Wachstumstemperaturen nicht mehr repliziert, wodurch die Tochtergenerationen die durch die Transformation aufgenommene Resistenz wieder verlieren (B.3). Somit bleibt die Resistenz nur bei Zellen erhalten, die das Plasmid bereits ins Chromosom integriert haben. Der letzte Selektionsschritt muss diese Merodiploiden von den echten Knock-Out-Mutanten trennen. Hier kommt die zweite Antibiotikaresistenz zum Einsatz, sie befindet sich zwischen den beiden homologen Bereichen, in diesem Fall handelt es sich um eine Tc-Resistenz. Diese wird auch nach dem zweiten Rekombinationsereignis weiterhin exprimiert, wohin gegen die Ery-Resistenz, ebenfalls aufgrund der unterdrückten Replikation bei erhöhten Temperaturen, verloren geht. Bei Zellen die ihre Ery-Resistenz verloren haben, aber weiterhin gegen Tc resistent bleiben, handelt es sich demnach um echte Mutanten. Dies kann durch PCR überprüft werden.

B.4.2 Vorgehensweise für das Plasmid pEX18Ap

Die Selektion in pEX18Ap verläuft grundlegend anders als mit pGh9. pEX18Ap kann in *L. casei* W56 nicht replizieren, daher entwickeln nur Bakterien, die nach dem ersten Rekombinationsereignis das Plasmid ins Genom aufgenommen haben, die darauf enthaltene

Ap- bzw. Tc-Resistenz. Die Selektion auf echte Knock-Out-Mutanten in Abgrenzung zu den Merodiploiden erfolgt durch Wachstum auf Agarplatten, die Saccharose enthalten. Da pEX18Ap ein *sacB*-Gen trägt, führt die Verstoffwechselung von Saccharose zum Zelltod der Merodiploiden. Auch hier ist zur Verifizierung eine PCR mit den erhaltenen Kolonien notwendig.

B.5 Bioinformatische Auswertung

B.5.1 Manuelle Überprüfung der Sequenzen und Erstellung von Konsensussequenzen

Sequenzen die durch Sangersequenzierung erstellt wurden, wurden anschließend einer manuellen Überprüfung unterzogen. Dabei wurde darauf geachtet, ob es bei Duplikaten oder überlappenden Sequenzen Unstimmigkeiten in einzelne Basen gab. Diese wurden dann anhand der Chromatogramme genauer korrekturgelesen und sofern eine eindeutige Entscheidung getroffen werden konnte, wurden Basenkorrekturen durchgeführt. Alignments wurden mit Hilfe der Software Seqman Pro (Lasergene Version 7.1.0, DNASTAR, Madison, USA) erstellt. Damit können Sequenzen zusammengesetzt werden zu einem sogenannten Contig und einer gemeinsamen Konsensussequenz, sofern sie einen gemeinsamen Überlappungsbereich besitzen. Stammten die Sequenzen aus Plasmiden, mussten vor der Analyse die Plasmid-Bestandteile an den Enden abgeschnitten werden.

B.5.2 Auswertung mit Newbler und RAST

Die Software Newbler (Version 2.8, Roche, Penzberg) ist ein *de novo* DNS Sequenz Assembler. Dieser wurde für die erste Erstellung von Contigs aus den 454-Sequenzierungsergebnissen verwendet. Dabei wurden die Länge der Überlappung auf 40 bp und die Identität der Basen auf 90 % festgelegt. Large Contigs besitzen mindestens eine Länge von 500 bp. Diese wurden dann mit RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) Version 4.0 (Aziz *et al.*, 2008), einem online kostenlos verfügbaren Tool für die Annotation von bakteriellen Genomen, bearbeitet. Die von Newbler generierten „Large Contigs“ (> 500 bp) wurden auf den RAST-Server geladen und dort automatisch annotiert.

B.5.3 Bioinformatische Aufarbeitung der sequenzierten Genome

Die weitere bioinformatische Aufarbeitung des sequenzierten Genoms von *L. casei* W56 wurde von Thomas Weinmaier vom „Department of Computational Systems Biology“ an der Universität Wien unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Rattei durchgeführt. Dies beinhaltet ein vergleichendes Assembly zwischen den aus dieser Arbeit erhaltenen Contigs von *L. casei* W56 (C.4.3) und dem bereits vollständig sequenzierten und nahe verwandten Stamm *L. casei* BL23 (Mazé *et al.*, 2010) als Referenz mit Hilfe der Software AMOScmp (Pop *et al.*, 2004). Dieses Zuordnen von Contigs durch Übereinstimmungen mit dem Genom eines nahe verwandten Organismus wird als „mapping“ bezeichnet.

Nachdem das Genom durch Nachsequenzierung geschlossen wurde (C.4.5), wurden die kodierenden Bereiche mit den Programmen Glimmer (Delcher *et al.*, 2007), Genemark (Lukashin & Borodovsky, 1998), Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010) und Critica (Badger & Olsen, 1999) bestimmt und mit Informationen aus einer BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1990) gegen die NCBI NR Datenbank (Sayers *et al.*, 2009) abgeglichen. Nichtcodierende RNAs wurden mit tRNAscanSE (Lowe & Eddy, 1997), RNAmmer (Lagesen *et al.*, 2007) und der Rfam Datenbank (Griffiths-Jones *et al.*, 2005) identifiziert. Die funktionelle Annotation der kodierenden Bereiche erfolgte über interproScan (Hunter *et al.*, 2012), Swissprot und trEMBL (Boeckmann *et al.*, 2003).

Diese Schritte umfassen sowohl die vollständige Annotation des Genoms, als auch die Reduzierung der Contigs.

B.6 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Die HPLC ist eine auf Flüssigchromatographie basierende Methode der instrumentellen Analytik. Mit dieser können Substanzen aufgetrennt und über Standards identifiziert und quantifiziert werden. Die HPLC-Säule besteht aus einer stationären Trägermatrix mit definierten Bindungseigenschaften. Die zu analysierende Probe wird mit einem flüssigen Laufmittel unter Druck über die Trägermatrix geleitet. Die Retentionszeit der in der Probe gelösten Stoffe ist abhängig von der Affinität dieser zu den Bindungsstellen der Trägermatrix. Nach dem die Stoffe die Säule verlassen haben, können sie über verschiedene Sensoren detektiert werden. In dieser Arbeit wurde hierfür ein UV-Detektor eingesetzt.

B.6.1 Vorbereitung der Proben für den Einsatz in der HPLC durch Festphasenextraktion (SPE)

Zur Aufreinigung, Entsalzung und für den ersten Konzentrierungsschritt wurden die Überstände über eine HF MEGA Bond Elut C18 SPE-Säule (6 ml, Agilent Technologies, Böblingen) gefiltert. Zur Vorbereitung wurde die Säule mit 3 ml MeOH (Merck, Darmstadt) gewaschen und anschließend mit 3 ml H₂O (Merck, Darmstadt) befeuchtet. Der Reinheitsgrad beider Flüssigkeiten war für die Chromatographie geeignet. Danach wurden die Proben aufgetragen und flossen mit einer Geschwindigkeit von ca. 10 Tropfen/min über die Säule. Nach der Probe folgen in fester Reihenfolge zum Waschen und Entsalzen je 2 ml H₂O und 10 % MeOH. Anschließend wurde mit 20 % MeOH eluiert. Das Elutionslaufmittel hatte eine Einwirkzeit von ca. 30 s bei geschlossenem Hahn. Außerdem lief die Säule vor und nach der Elution trocken, um die Ausbeute zu erhöhen. Die 20 % Fraktion wurde gesammelt und mit einem Rotilabo®-Spritzenfilter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert, um die HPLC-Säule vor Verunreinigungen zu schützen. Anschließend wurden die Fraktionen durch Trocknung weiter konzentriert (B.6.2).

B.6.2 Aufkonzentrierung in der Vakuumzentrifuge

Um eine höhere Konzentrierung des Trps in den Proben zu erreichen wurden die aus der SPE gesammelten Fraktionen in einer Univapo100ECH Vakuumzentrifuge (UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg) auf ca. 300 µl eingeeengt. Für eine möglichst schonende Behandlung der Proben wurde die Temperatur in der Zentrifuge auf 20 °C eingestellt.

B.6.3 HPLC basierende Analytik zur Trennung von D- und L-Tryptophan

Die chirale Auftrennung von D- und L-Tryptophan durch HPLC erfolgte mit einer Chirex 3126 Säule 150 x 4,6 mm (Phenomenex LTD, Aschaffenburg). Hierbei handelt es sich um eine Liganden-Austausch-Chromatographie mit D-Penicillamin als Elektronenakzeptor. Diese Technik soll nach Optimierung der Methode, für die Messung von D-Tryptophan in den Zellüberständen eingesetzt werden. Als Vorsäule, zum Schutz der Chirex-Säule, wurde die vom Hersteller empfohlene SecurityGuard Cartridge 4 x 3,0 mm (Phenomenex LTD, Aschaffenburg) mit C18 als Säulenmaterial verwendet. Die Laufmittel wurden isokratisch

eingesetzt (30 % MeOH, 70 % 2 mM CuSO₄), der Druck betrug ca. 150 bar und die Durchflussrate wurde auf 1.0 ml/min festgesetzt, bei einer Gesamtlaufdauer von 65 min (Varian Pro Star Model 230, Varian, Böblingen). Da es sich bei Tryptophan um eine aromatische Aminosäure handelt ist zur Detektion ein GYNKOTEK® SP 6 UV-Detektor (GynkoteK, Röstath) geeignet. Bei Anregung durch Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm erfolgt die Emission bei 308- 350 nm (Vivian & Callis, 2001). Für konstante Temperaturverhältnisse in der Säule während der Messungen sorgte ein in einen Autosampler (Varian Pro Star, Model 410, Varian, Böblingen) integrierter Säulenofen der auf 35 °C eingestellt wurde. Die Auswertung wurde mit der Software Interactive Graphics 6.0 von Varian (Böblingen) durchgeführt, wobei die Grenzen der jeweiligen Peaks manuell bestimmt wurden. Aus der Gesamtfläche (counts) lässt sich die Konzentration der eingesetzten Trp-Menge bestimmen.

C Ergebnisse

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Ergebnisse gliedern sich in fünf Hauptpunkte. Zu Beginn stehen allgemeine organismische Untersuchungen zum Wachstum der verwendeten Bakterienstämme, sowie eine kurze Darstellung der Ergebnisse aus der bereits beschriebenen Kooperation mit Immunologen und Chemikern. Diese ergab die Identifikation eines immunologisch aktiven Moleküls aus den bakteriellen Zellüberständen. Für dieses Molekül wurde im nächsten Punkt ein quantitativer Nachweis mittels SPE und HPLC optimiert. Dem folgt die *shot-gun* Sequenzierungen und Annotation zweier ausgewählter Lactobacillengenome, wobei eines der Genome vollständig geschlossen wurde. Der nächste Schritt beinhaltet die Vorbereitungen für die Generierung einer Knock-Out-Mutante dieses Stammes über homologe Rekombination.

C.1 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten verschiedener Gram-positiver probiotischer Bakterien

Die hier durchgeführten Untersuchungen des Wachstumsverhaltens der unterschiedlichen probiotischen Bakterien waren nötig, um möglichst einheitliche Bedingungen für die Ernte der Zellüberstände zu schaffen. Dies war vor allem entscheidend für die folgenden Analysen der Metaboliten aus den Zellüberständen, aber auch für die Versuche hinsichtlich der Anwesenheit immunologisch aktiver Moleküle. Bei beiden Aspekten sollten unterschiedliche Bakterien miteinander verglichen werden, deswegen mussten die Unterschiede in den Anzuchtbedingungen so gering wie möglich sein. Es wurde festgelegt, dass die Ernte standardmäßig in der frühen stationären Phase durchgeführt wurde. Darüber hinaus war ein definiertes Medium für die analytischen Auswertungen notwendig. Denn die hochauflösenden, chemische Analysen von Metaboliten, welche von den Bakterien produziert werden, ist nur in einem Medium mit reinen Inhaltsstoffen möglich ist. Daher konnte das MRS-Medium hierfür nicht verwendet werden.

In Vorversuchen wurde das Wachstum von *L. rhamnosus* GG in den beiden definierten Medien CDMI und DML verglichen. Die maximale optische Dichte, die in der stationären Phase gemessen wurde, betrug in CDMI 0,3, in DML jedoch nur 0,04 (B.1.4). Daher wurde CDMI gegenüber DML bevorzugt als Anzuchtmedium verwendet. Anschließend wurde das Wachstum aller Bakterien in Voll- und definierten Medien getestet. In CDMI konnte für alle Stämme, außer W19, Wachstum festgestellt werden. Nach Auswahl der Medien wurde die

maximale optische Dichte bestimmt die die jeweiligen Stämme im Voll- und definierten Medium erreichen können (Abb. C.1). Dabei waren die erreichten Zelldichten im definierten Medium stets geringer als im Vollmedium. Das Verhältnis zwischen maximaler OD_{600} in definiertem Medium im Vergleich zum Vollmedium schwankte zwischen 3 %, z.B. bei *L. rhamnosus* GG, und 72 % bei *E. faecium* W54.

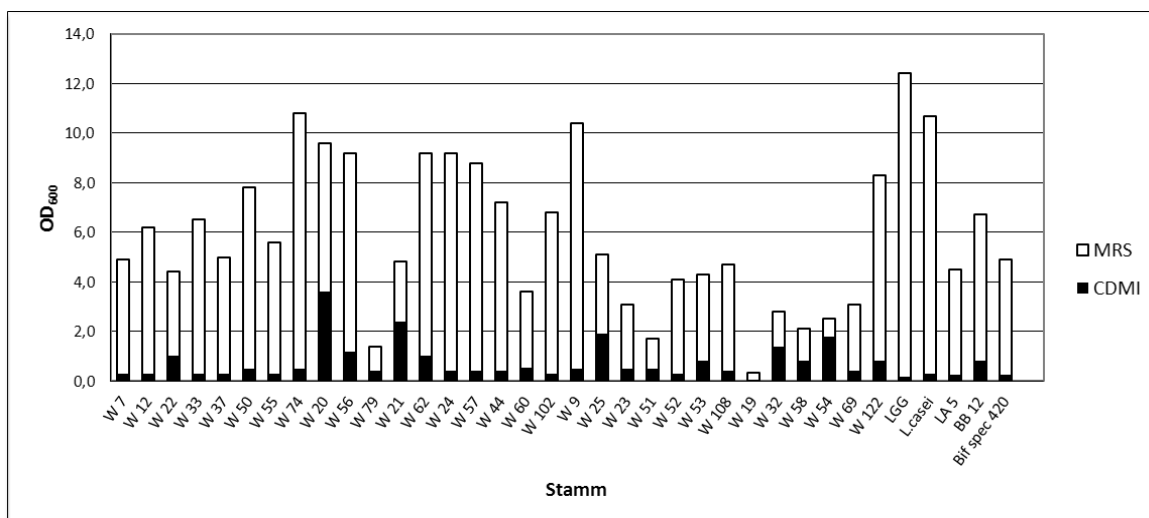


Abb. C.1 Maximale OD_{600} verschiedener Gram-positiver Bakterien in MRS Medium und CDMI im Vergleich.

Zudem erreichten die Bakterien in CDMI nicht in jedem Ansatz die hier gezeigte maximale OD_{600} . In MRS-Medium war die maximale Zelldichte nahezu konstant. Daher musste im definierten Medium das Erreichen der stationären Phase für jede Ernte neu bestätigt werden. Dies wurde durch Messungen der OD_{600} in zeitlichem Abstand abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit gewährleistet. Für ausgewählte Stämme wurden in Voll- und definiertem Medium Wachstumskurven angefertigt. In Abb. C.2 sind exemplarisch die Wachstumskurven von *L. casei* W56 dargestellt.

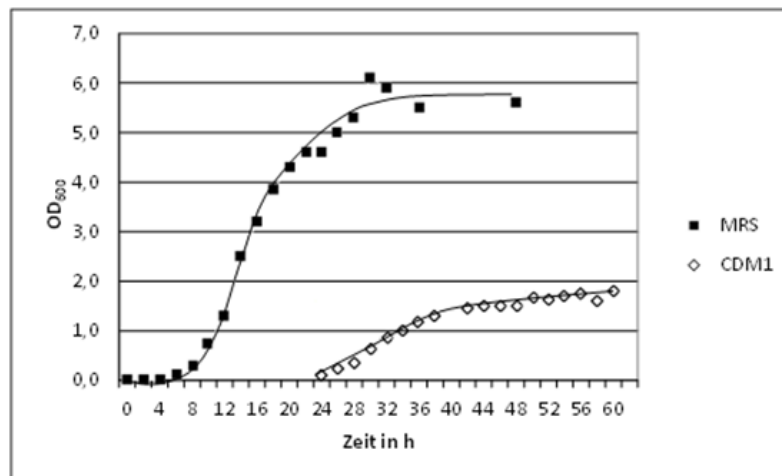


Abb. C.2 Wachstumskurve *L. casei* W56. Vergleich der Zelldichte von *L. casei* W56 in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer in MRS-Medium und CDM1.

Die Wachstumskurven dienen als Anhaltspunkt, sowohl für die maximale Zelldichte, als auch für die Wachstumsgeschwindigkeit. Auch hier unterschied sich das Wachstum in den beiden Medien stark voneinander. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Stämmen vermehrten sich die Zellen im Vollmedium deutlich schneller als im definierten Medium.

Diese Ergebnisse lieferten die Grundvoraussetzungen, um sicherzustellen, dass sich alle Kulturen zur Zeit der Probennahme in der stationären Wachstumsphase befanden. Dies war nötig um Vergleiche zwischen den Überständen verschiedener Bakterien anzustellen.

C.2 Identifikation von D-Tryptophan als immunologisch aktive Substanz

Die Grundlage für die weiteren Versuche, die innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden, lieferten die Ergebnisse aus einer Kooperation mit Immunologen und Chemikern (siehe A.6). Eine detailliertere Darstellung findet sich unter G.1.

Ziel war die Identifikation einer bei menschlichen Zellen immunmodulatorisch aktiven Substanz, die von Gram-positiven probiotischen Bakterien sekretiert wird. In dieser Zusammenarbeit wurden bakterielle Überstände, die in der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden (vgl. B.1.3), durch die immunologischen Kooperationspartner am CPC in zwei Bioassays mit humanen Zelllinien auf ihre immunmodulatorische Aktivität hin geprüft (vgl. G.1.1).

Um aus dem gesamten Zellüberstand eine aktive Substanz zu isolieren, wurden verschiedene Fraktionierungen von der Abteilung BioGeoChemie und Analytik durchgeführt und die einzelnen Fraktionen mit den immunologischen Assays erneut getestet. Die erste Fraktionierung wurde durch Festphasenextraktion (SPE) erreicht, wie sie später auch in dieser Arbeit verwendet wurde (B.6.1). Die einzelnen Fraktionen haben als Elutionsmittel steigende MeOH-Konzentrationen in Wasser. Nur die Fraktionen mit 20 %, 40 % und 50 % MeOH zeigten in den immunologischen Tests Aktivität. Diese war in der 20 % Fraktion ein wenig höher als in den beiden übrigen. Außerdem ist aus bisherigen Erfahrungen bekannt, dass die kleinen polaren Moleküle, die sich gewöhnlich in dieser Fraktion lösen, leicht zu identifizieren sind. Daher wurde zunächst aus Gründen der Fokussierung die 20 %-MeOH Fraktion mit Hilfe von Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) in weitere Subfraktionen unterteilt (G.1.2). Die Subfraktionen, die Aktivität zeigten, wurden vereinigt und als aktive Komponente konnte daraus D-Tryptophan (D-Trp) identifiziert werden. Für die Identifizierung wurden "Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry" (FT-ICR-MS) und "Nuclear Magnetic Resonance" (NMR) als analytische Methoden eingesetzt.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, und um zwischen den beiden Tryptophan-Isomeren zu unterscheiden, wurden D- und L-Tryptophan als Reinsubstanzen, in Konzentrationen von 0,1 nM bis 50 µM, in den immunologischen Testverfahren eingesetzt und verglichen. Im Gegensatz zu L-Tryptophan zeigte D-Tryptophan eine vergleichbare Wirkung wie zuvor die Zellüberstände und Fraktionen. Bereits ab Konzentrationen von 10 nM D-Trp war ein Effekt erkennbar (G.1.3).

C.3 Entwicklung einer HPLC-basierten Analytik zur Untersuchung der D-Trp-Produktion in bakteriellen Zellüberständen

Um das von den Bakterien produzierte D-Trp detektieren zu können, sollte ein zusätzliches Testsystem entwickelt werden. Mit diesem sollte es möglich sein, über HPLC-Analysen den Gehalt an D-Trp in den Zellüberständen zu bestimmen. Dies würde breit angelegte Screeningversuche ermöglichen. Im Folgenden werden die Optimierung der HPLC-Methode und die anschließenden Tests mit bakteriellen Überständen dargestellt.

C.3.1 Erstellen der Standardgerade

Zunächst wurde die Sensitivität einer chiralen Säule für D- und L-Trp als Reinsubstanzen in 20 % MeOH getestet. Diese wurde anhand einer Standardgeraden ermittelt, wodurch gleichzeitig gezeigt wurde in welchem Konzentrationsbereich die Methode zur quantitativen Auswertung verwendet werden kann. Abb. C.4 zeigt die zugehörigen Chromatogramme, es wurde jeweils dieselbe Konzentration der beiden Isomere eingesetzt. Die Identifikation der Peaks erfolgte nach Angaben der Hersteller und wurde im Vorfeld über Lösungen, die nur jeweils eines der Isomere enthielten, überprüft. Daher war bekannt, dass es sich bei dem Peak mit der kürzeren Retentionszeit um L-Trp handelt, der darauf folgende Peak ist D-Trp.

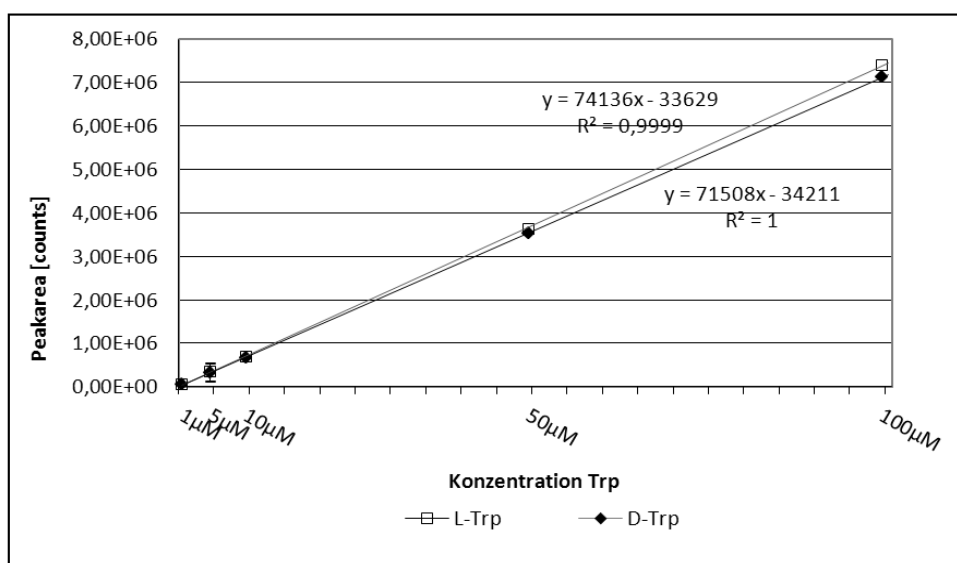


Abb. C.3 HPLC-Standardgeraden für L- und D-Trp.

Y = Peakfläche; R = Bestimmtheitsmaß der Geraden

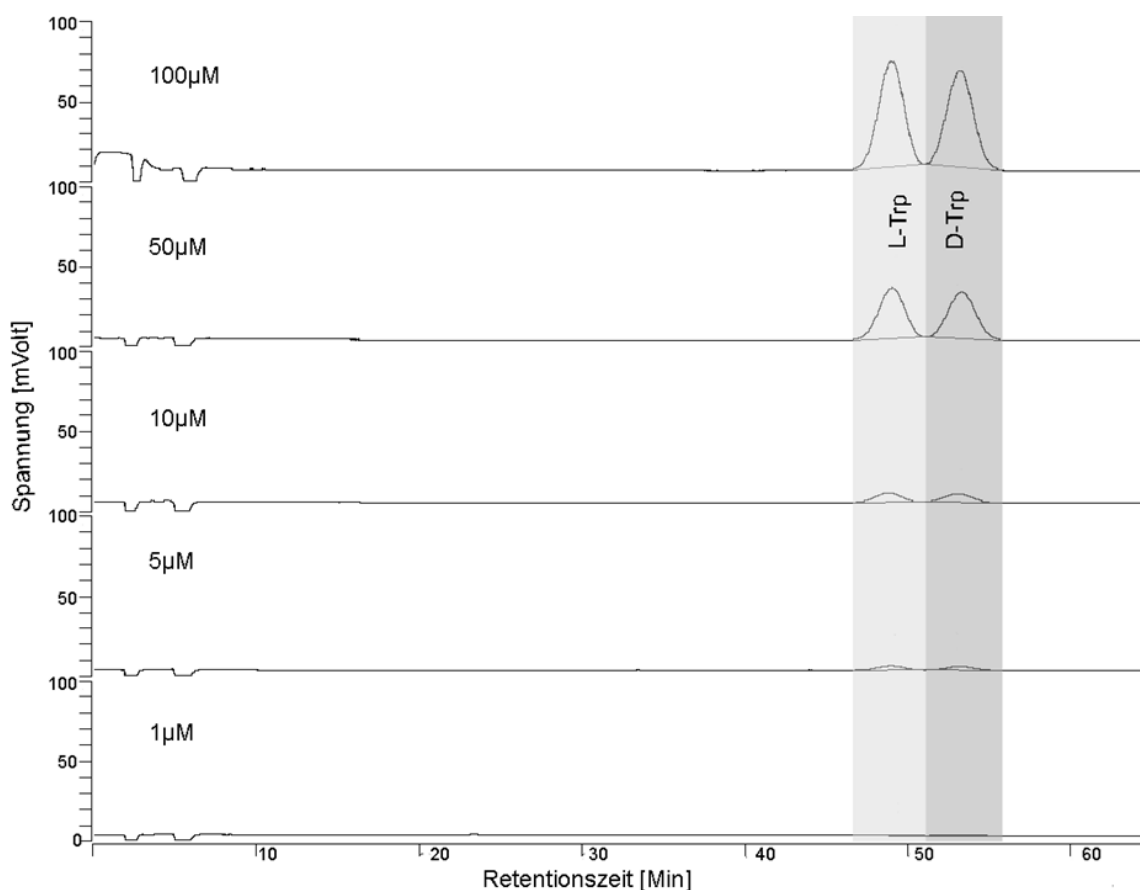


Abb. C.4 Chromatogramme der HPLC zur Berechnung der Standardgerade. Die Retentionszeit von L-Trp ist kürzer als die von D-Trp.

Aus der Integration der Peakfläche wurde eine Standardgerade in Abhängigkeit von der Konzentration erstellt.

Zur Berechnung der Konzentrationen in einer unbekannten Probe stehen damit folgende Gleichungen zur Verfügung:

$$\text{L-Trp:} \quad y = 74136x - 33629$$

$$\text{D-Trp:} \quad y = 71508x - 34211$$

Dabei ist y die Peakfläche und x die Konzentration in μM . Das Bestimmtheitsmaß R^2 hat für die Standardgerade von L-Trp den Wert 0,9999, für D-Trp erreicht es einen Wert von 1.

Bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ist eine Quantifizierung möglich, darunter ist auch eine qualitative Auswertung nicht eindeutig.

C.3.2 Ermittlung des optimalen Elutionsvolumens für die SPE und Berechnung der Rückgewinnungsrate

Um die HPLC-Säule zu schonen wurden die Proben bevor sie aufgetragen wurden über SPE gereinigt und entsalzt. Als Vorversuch war es hier notwendig das optimale Elutionsvolumen zu ermitteln. Da bereits aus den Vorversuchen bekannt war, dass Trp in der 20 % MeOH-Fraktion eluiert wird, wurde bei dieser Fraktion mit der Optimierung angesetzt. Zusätzlich zu der Variation im Elutionsvolumen, gab es noch drei weitere Änderungen in der Durchführung, welche die Menge an eluiertem Trp erhöhen sollten: Das Elutionsmittel hatte ca. 30 s Einwirkzeit und wurde auf 1 ml Subfraktionen unterteilt. Außerdem lief die Säule vor und nach der Elution trocken.

In Abb. C.5 ist die Verteilung an eluiertem D- und L-Trp, prozentual zu der eingesetzten Gesamtmenge graphisch dargestellt. Die Rohdaten dazu finden sich in Tabelle C-1. Weder in der 10 %- noch in der 30 % MeOH-Fraktion wurde Trp eluiert. Die Elution begann mit der ersten Subfraktion mit 20 %igem MeOH. Der größte Anteil wurde in der zweiten Subfraktion verzeichnet, nach 4 ml war kein Trp mehr im Eluat detektierbar.

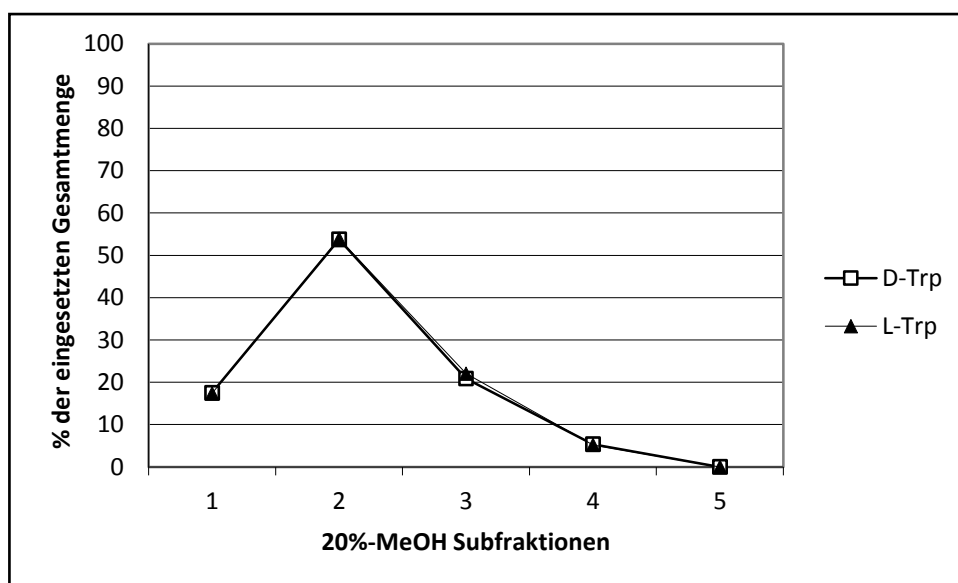


Abb. C.5 Ermittlung des optimalen Elutionsvolumens in der SPE. Die 20 % MeOH-Fraktion wurde in weitere Subfraktionen unterteilt.

Tabelle C-1 *Ermittlung des optimalen Elutionsvolumens in der SPE. Die 20 % MeOH-Fraktion wurde in weitere Subfraktionen unterteilt. Die graphische Darstellung findet sich in Abb. C.5*

Fraktion	L	Konz [μM]	Menge [μmol]	%	D	Konz [μM]	Menge [μmol]	%
10%	0	0	0	0	0	0	0	0
1	223830	3,5	0,0035	17,4	215809	3,5	0,0035	17,5
2	765723	10,8	0,0108	53,9	734654	10,8	0,0108	53,8
3	292900	4,4	0,0044	22,0	275885	4,2	0,0042	20,9
4	43553	1,0	0,0010	5,2	45839	1,1	0,0011	5,4
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	nicht gemessen				nicht gemessen			
7	nicht gemessen				nicht gemessen			
30%			0	0			0	0
Summe			0,0197	98,5			0,0195	97,5

Für die weiteren Versuche wurde daher mit 4 ml 20 % MeOH eluiert. Mit der bisherigen SPE-Methode konnte eine Ausbeute von 60-65 % erzielt werden. Nach der Optimierung des Elutionsvolumens und des Elutionsverfahrens lag der Prozentsatz für D-Trp bei 97,5 % und für L-Trp bei 98,5 % der eingesetzten Gesamtmenge. Es ging also nur ein sehr geringer Anteil von 2,5-1,5 % durch die Aufreinigung verloren.

C.3.3 Kapazität der SPE-Säule

Die SPE diente jedoch nicht nur der Schonung der HPLC-Säule, sondern gleichzeitig ist es eine Möglichkeit die Proben zu konzentrieren. Nach Ergebnissen von Inge Kepert war es sehr wahrscheinlich, dass sich die in den Überständen vorkommenden Konzentrationen im nanomolaren Bereich bewegen, was nach den Ergebnissen aus C.3.1 eine Konzentrierung für die Detektion mit der hier vorgestellten HPLC-Methode nötig machte.

Für eine maximale Konzentrierung über die SPE war es notwendig die Kapazität der SPE-Säulen mit CDML, dem Trp zugesetzt wurde, zu ermitteln, da CDML auch für die Anzucht der Bakterien verwendet wurde. Aus Abb. C.6 und Tabelle C-2 ist ersichtlich, dass die Menge an eluiertem D-Trp, durch Erhöhen des eingesetzten Volumens an mit Trp versetztem Medium, ab 20 ml eine Sättigung erreichte. Daher wurde für die weiteren Versuche 20 ml Zellüberstände eingesetzt.

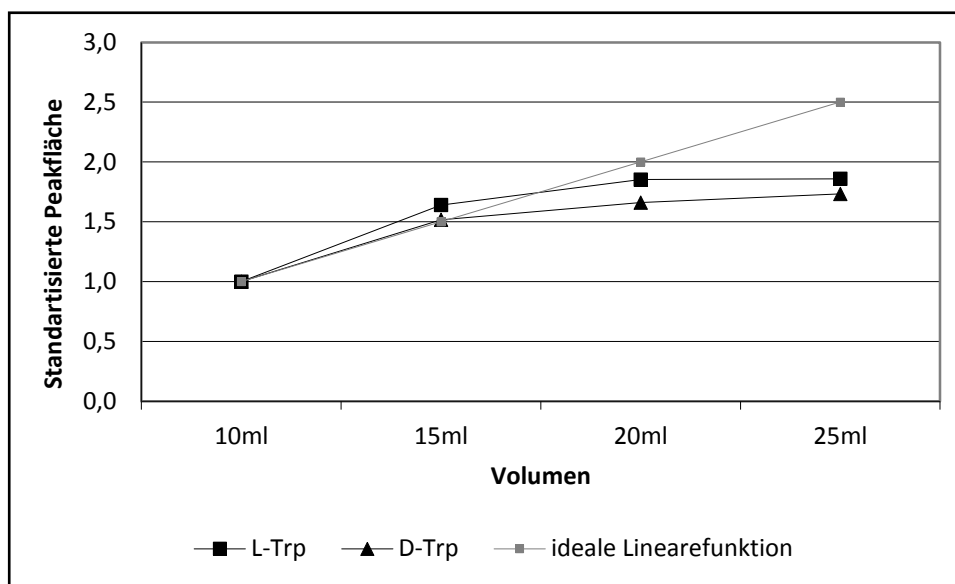


Abb. C.6 Ermittlung des maximal einzusetzenden Probenvolumens bis zur Sättigung. Die Fläche bei 10 ml wurde auf den Wert 1 normiert.

Tabelle C-2 Ermittlung des maximal einzusetzenden Probenvolumens.
Counts = Peakfläche

Volumen	Tats. Verhältnis	L-Trp		D-Trp	
		[Counts]	Verhältnis	[Counts]	Verhältnis
10 ml	1	2055650	1,0	1988258	1
15 ml	1,5	3372929	1,6	3017005	1,5
20 ml	2	3808650	1,9	3301815	1,7
25 ml	2,5	3823283	1,9	3445027	1,7

C.3.4 Bestimmung der neuen Detektionsgrenze als Folge der Optimierungsschritte

Zusätzlich zu der in C.3.3 beschriebenen Konzentrierung durch SPE ist eine weitere Konzentrierung durch Trocknung in einer Vakuumzentrifuge (B.6.2) möglich. Damit soll die Menge an D-Trp in den Proben soweit konzentriert werden, dass sie innerhalb der Nachweisgrenze des Detektors liegt. Für die Durchführung einer HPLC ist ein Volumen von 300 µl pro Probe nötig. Dies bedeutet, dass die 4 ml Eluat aus der SPE auf 300 µl konzentriert werden konnten. Daraus resultiert eine weitere theoretische Konzentrierung um Faktor 13. Aus der in C.3.3 und diesem Abschnitt beschriebenen Konzentrierung ergibt sich eine neue Detektionsgrenze die weitaus sensitiver ist, als die in C.3.1 erstellte. In Tabelle C-3 sind die

Werte der durch die Konzentrierung und Reinigungsschritte erhaltenen Standardgeraden angegeben.

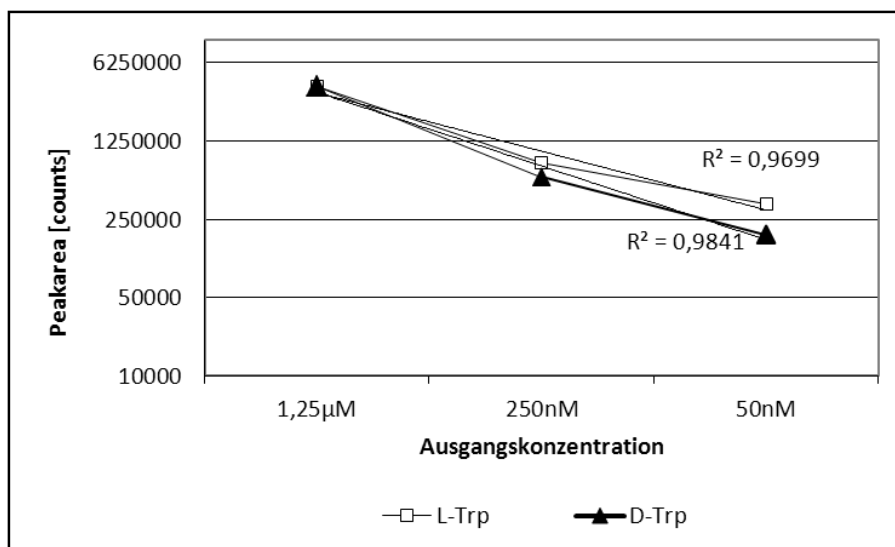


Abb. C.7 Standardgeraden für D- und L-Trp nach Optimierung des Proben- und Elutionsvolumens

Tabelle C-3 Erhöhung des Sensitivitätsbereichs

Ausgangs-Konzentration	L-Trp [Counts]	D-Trp [Counts]
1,25 µM	3840637	3821319
250 nM	794449	599245
50 nM	343167	183508
10 nM	-	-

Eine quantitative Bestimmung der Ausgangskonzentration war für beide Isomere bis zu 250 nM möglich. Die Peakfläche für den Standard mit 1,25 µM Tryptophan nach der Konzentrierung entsprach nach den in C.3.1 erstellten Standardgeraden in etwa einer Endkonzentration von 52 µM Tryptophan. Dies bedeutete eine Gesamtkonzentrierung durch SPE und Trocknung um den Faktor 42. In weiteren Versuchen wurde die minimale Grenze für die Detektion bestimmt, sie lag bei 25 nM Ausgangskonzentration an Trp.

C.3.5 Messungen der Zellüberstände von Kulturen von *L. rhamnosus* GG, *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102 auf das Vorhandensein von D-Trp

Im Anschluss an die Optimierung der Methode wurden Zellüberstände von *L. casei* W56, *L. rhamnosus* GG und *L. rhamnosus* W102 getestet. Als Negativkontrolle wurde CDMI eingesetzt. Für diesen Versuch wurde die Menge an ursprünglich im Medium enthaltenen L-Trp von 2,7 mM auf 50 μ M reduziert, dennoch wird durch die Konzentrierungsschritte die Menge an L-Trp so weit erhöht, dass ein möglicherweise vorhandener D-Trp-Peak überdeckt wurde. In Abb. C.8 sind zur Verdeutlichung der Schwierigkeit die Chromatogramme des Standards und der Negativkontrolle (CDMI 50 μ M L-Trp) dargestellt.

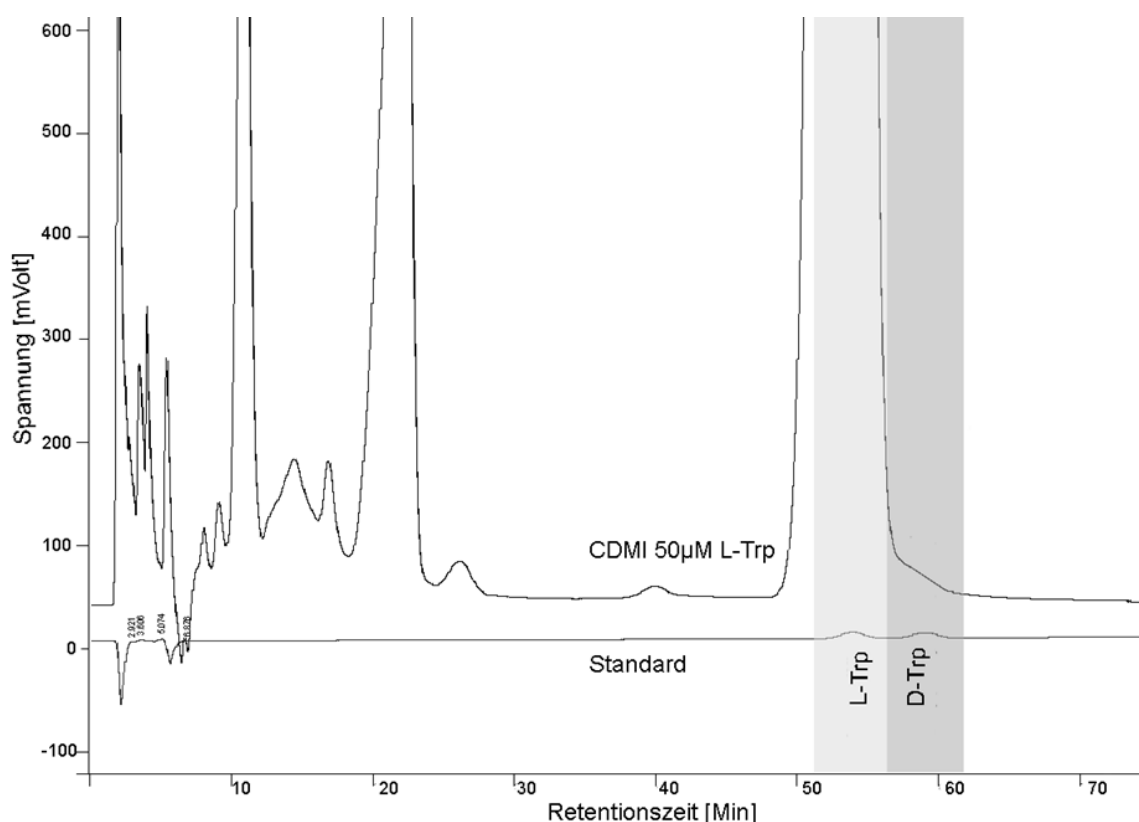


Abb. C.8 Chromatogramm der CDMI-Negativkontrolle mit 50 μ M L-Trp (obere Linie) im Vergleich mit einem Standard (unten).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden weitere Zellüberstände aus CDMI ohne L-Trp gewonnen. Jedoch konnte hier weder in Überständen von *L. rhamnosus* GG, noch von *L. casei* W56, D-Trp nachgewiesen werden (Abb. C.9). Als zusätzliche Kontrolle für die Extraktionsmethode wurde CDMI mit D-Trp (5 μ M) versetzt.

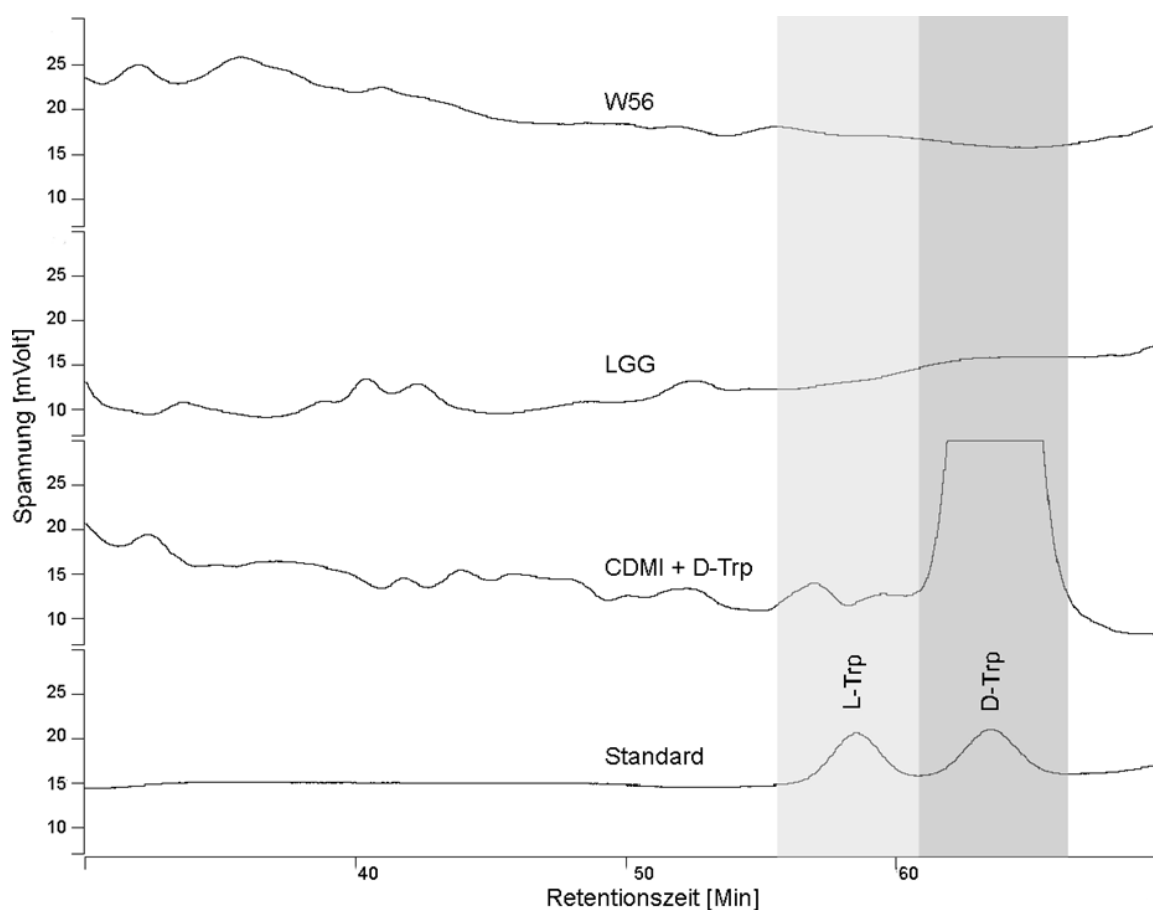


Abb. C.9 Chromatogramme von *L. rhamnosus* GG und *L. casei* W56 in CDMI ohne L-Trp. Als zusätzliche Kontrolle wurde hier mit D-Trp versetztes CDMI ebenfalls analysiert.

In einem weiteren Versuch wurde die Trp-Vorstufe Chorismat, sowie die potentielle D-Trp-Vorstufe D-Serin dem Medium zugegeben, jedoch weiterhin auf L-Trp verzichtet. Jedoch konnte auch in den daraus gewonnenen Überständen kein D-Trp nachgewiesen werden. Daraus kann vermutet werden, dass die D-Trp-Synthese wahrscheinlich von L-Trp abhängig ist.

C.3.6 L-Trp Konzentration

Die nächste Stufe war eine Reduzierung der L-Trp-Konzentration im Medium, statt des kompletten Verzichts. Dabei wurde zunächst die minimale Konzentration getestet, bei der auch geringe Mengen D-Trp noch detektiert werden konnten.

Bei einer L-Trp-Konzentration von 10 μM lässt sich eine D-Trp-Konzentration von 100 nM detektieren, wohingegen eine Konzentration von 50 nM D-Trp durch die Schulter des L-Trp-Peaks überdeckt wird (Abb. C.10).

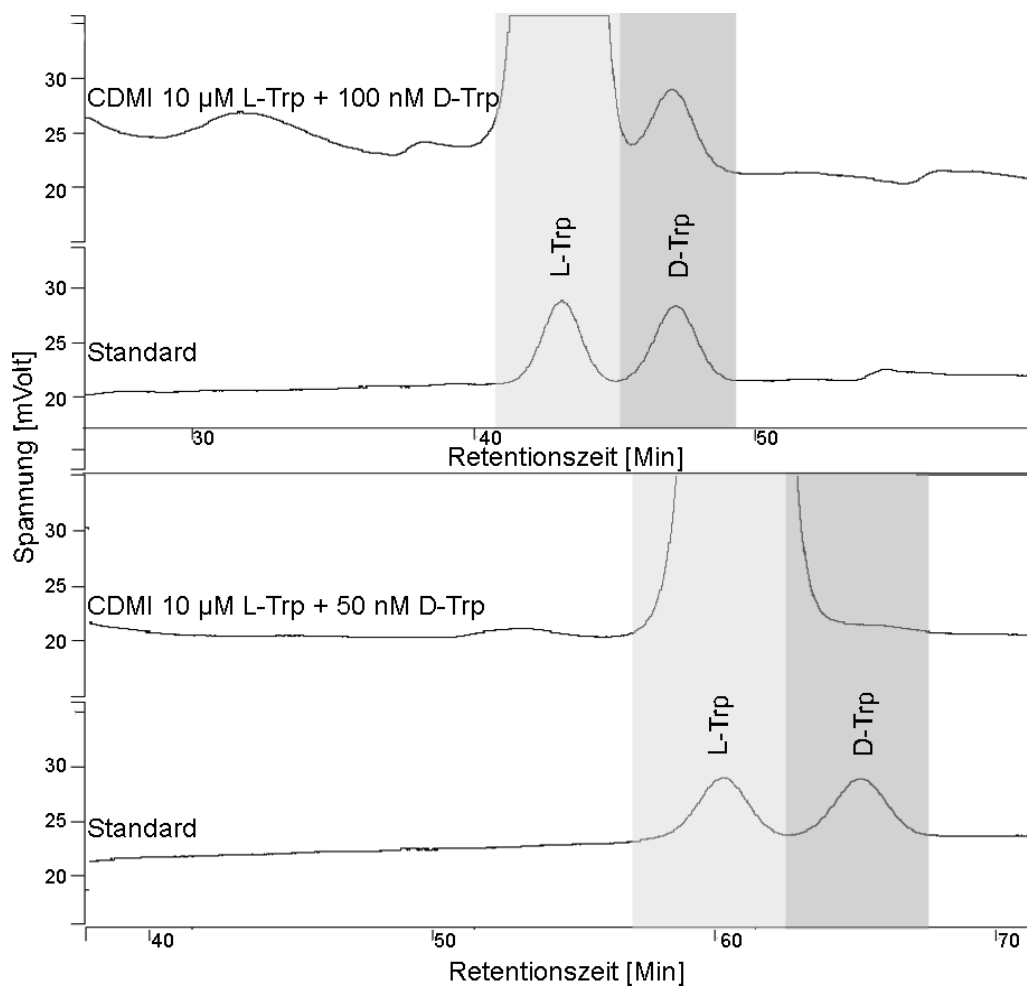


Abb. C.10 CDMI mit 10 µM L-Trp. C. Im oberen Chromatogramm befinden sich zusätzlich 100 nM D-Trp im Medium unten 50 nM. Unter den Chromatogrammen befindet sich der jeweils zugehörige Tagesstandard.

Um eine Konzentration von 50 nM D-Trp im Medium zu detektieren, darf die L-Trp-Konzentration maximal 5 µM betragen. Das Chromatogramm wird jedoch deutlicher bei einer Konzentration von nur 500 nM L-Trp (Abb. C.11).

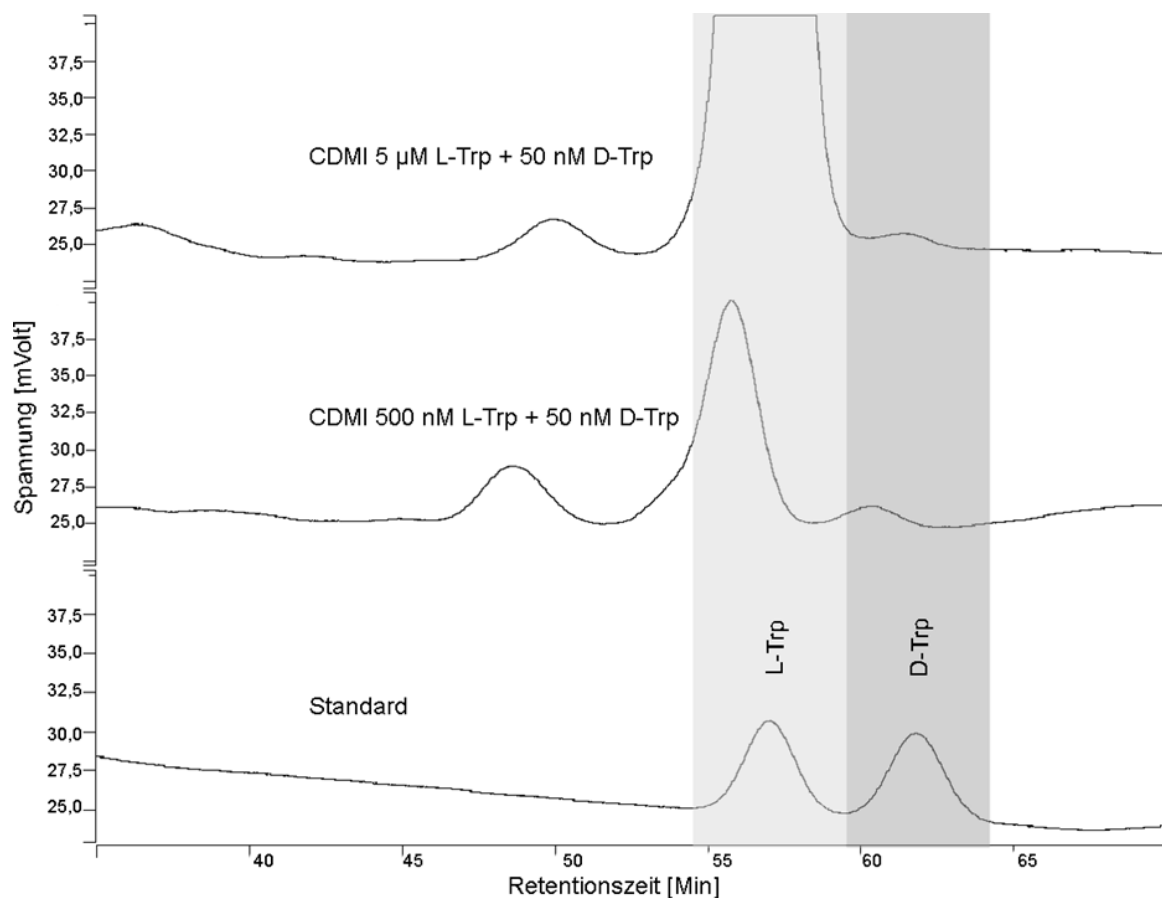


Abb. C.11 CDMI mit 50 nM D-Trp. Im obersten Chromatogramm befinden sich zusätzlich 5 µM L-Trp im Medium, darunter unten 500 nM L-Trp.

Für die weiteren Untersuchungen der D-Trp-Produktion in *L. rhamnosus* GG und *L. casei* W56, wurden daher 5 µM bzw. 500 nM L-Trp als Ausgangskonzentration im Medium eingesetzt. Jedoch konnte die Produktion von D-Trp nicht eindeutig nachgewiesen werden.

C.4 Genomsequenzierung *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102

Für die Untersuchung des D-Trp-Biosynthesewegs sollten genetische Unterschiede, zwischen einem Stamm der D-Trp produziert und einem der kein D-Trp produziert, weitere Informationen liefern. Dazu musste die Genomsequenz dieser Stämme erstellt werden. Aus diesem Grund wurden zwei nahverwandte Lactobacillenstämme ausgewählt (C.4.1), die die oben genannte Bedingung erfüllten, und mit Hilfe der 454-Pyrosequencing-Technik sequenziert (B.2.4.2). Außerdem wurde *L. rhamnosus* GG als zusätzlicher D-Trp produzierender Stamm zu weiteren Vergleichen herangezogen, da dessen Genomsequenz bereits in Datenbanken verfügbar war. Ein hoher Verwandtschaftsgrad der beiden Stämme, die in dieser Arbeit sequenziert wurden, zu *L. rhamnosus* GG war daher ebenfalls Voraussetzung. Des Weiteren wurde die Sequenz von *L. casei* W56 komplett geschlossen (C.4.4, C.4.5) und annotiert (C.4.4).

C.4.1 Auswahlkriterien und vorläufige phylogenetische Einordnung der verwendeten Stämme

Um Anhaltspunkte für mögliche Zielgene zur Generierung einer Knock-Out-Mutante zu erhalten, wurden die Genome eines nicht-immunmodulatorisch aktiven Stamms, eines D-Trp produzierenden Stammes, sowie des ebenfalls D-Trp produzierenden Stamms *L. rhamnosus* GG, miteinander verglichen. Damit die Unterschiede in den Genomen der Bakterien möglichst gering waren und damit leichter zu vergleichen, wurden sie aufgrund eines möglichst hohen Verwandtschaftsgrades basierend auf der Analyse der 16S-rRNA ausgewählt. Als D-Trp positiver Stamm wurde *L. casei* W56, als immunmodulatorisch negativer Stamm wurde *L. rhamnosus* W102 gewählt. Von beiden waren keine Genomsequenzdaten verfügbar. Daher mussten diese zunächst erstellt werden.

Eine vorläufige grobe phylogenetische Einteilung stützte sich auf die Ergebnisse der API50-Tests (B.1.5) und die Angaben der Firma Winclove. Zur Verifizierung wurden die jeweiligen 16S-rRNS-codierenden Gene sequenziert (B.2.4.1) mit anschließender phylogenetischer Einordnung der Sequenzen mithilfe der auf die Datenbank SILVA (Quast *et al.*, 2012; Pruesse *et al.*, 2012) gestützten Software ARB (Ludwig *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse der API-Tests wiesen darauf hin, dass es sich bei W56 um *L. rhamnosus*, *L. casei* oder *L. paracasei* handelt (Abb. C.12, G.2). Durch Fermentationsprofile kann diese

Gruppe zwar von anderen Lactobacillen abgegrenzt werden, die drei Spezies können jedoch nicht voneinander unterschieden werden (Ward & Timmins, 1999).

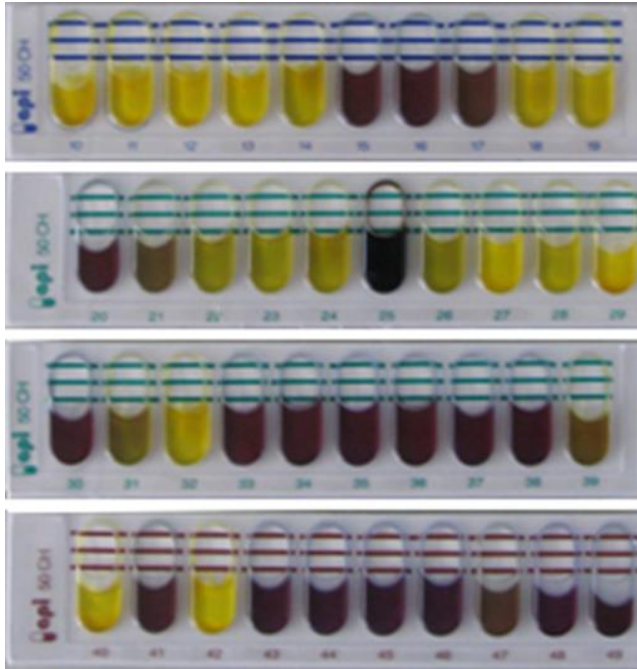


Abb. C.12 API50-Test für *L. casei* W56. Abgebildet sind die Mikroröhrchen 10-49. Eine gelbe Färbung zeigt einen Abbau der enthaltenen Kohlenstoffquelle durch das Bakterium an.

Im resultierenden Dendrogramm basierend auf der 16S-rRNA-Analyse (Abb. C.13) fiel W56 in den Zweig der *L. casei* und W102 zu den *L. rhamnosus*. In den Distanzmatrizen (Abb. C.14, Abb. C.15, Abb. C.16) sieht man für W56 eine 99,9 %-ige Übereinstimmung mit Stämmen der Spezies *L. casei* und W102 wies eine 100 %-ige Übereinstimmung mit den 16S-rDNS Sequenzen von *L. rhamnosus* auf. Die Übereinstimmung zwischen den *L. rhamnosus* Stämmen und *L. casei* W56 lag bei 98,8 %. Aufgrund dieser Hinweise werden die Stämme in dieser Arbeit, wie auch von Winlove angegeben, als *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102 bezeichnet, obgleich eine eindeutige Abgrenzung zweier Spezies nur möglich ist, wenn die Übereinstimmungen der 16S-rRNS weniger als 97 % betragen und für eine klare Einordnung weitere Analysen nötig sind. Für die Einordnung im Rahmen dieser Arbeit waren die Ergebnisse auf 16S-rRNS-Ebene ausreichend.

Dies wiederum verdeutlicht aber die enge Verwandtschaft der drei ausgewählten Bakterien zueinander, womit die eingangs geforderten Kriterien erfüllt wurden.

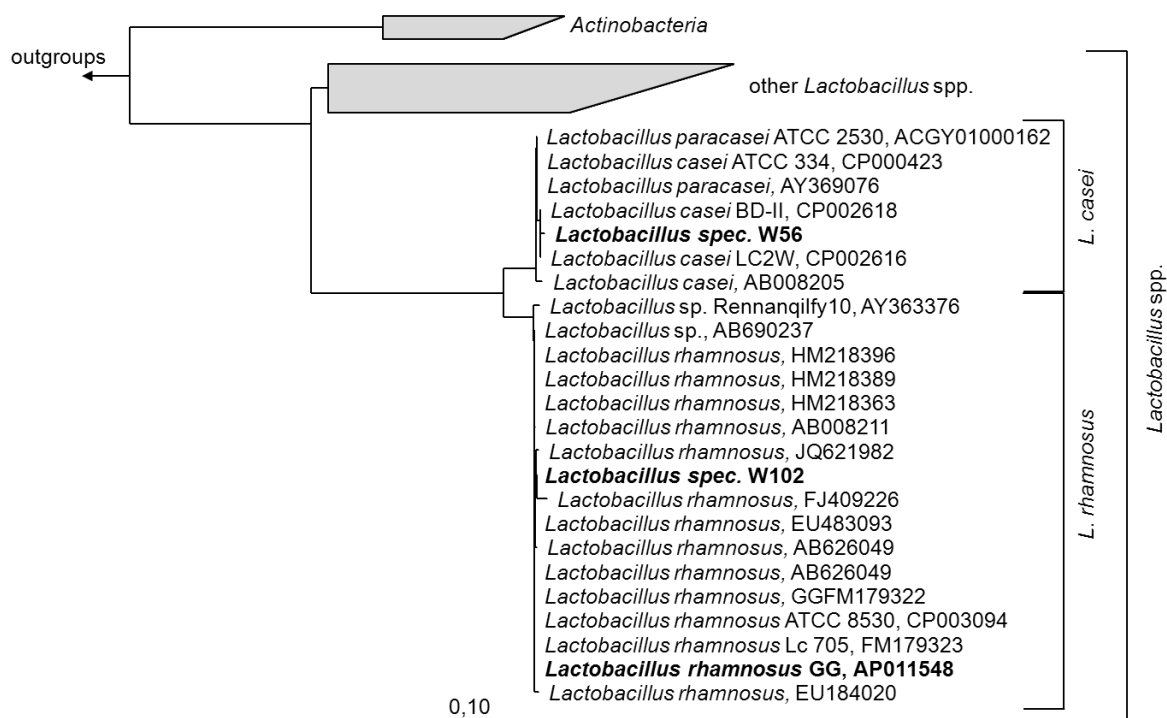


Abb. C.13 Dendrogramm für *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* W102 und *L. casei* W56 basierend auf den 16S-rRNS Analysen. Der Balken gibt 10% Sequenzdivergenz an.

	<i>Lactobacillus pantheris</i> , AF413523	<i>Lactobacillus thailandensis</i> , AB257863	<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC2530, ACGY01000162	<i>Lactobacillus casei</i> , ATCC334, CP000423	<i>Lactobacillus paracasei</i> , AY369076	<i>Lactobacillus casei</i> , BD-II, CP002618	<i>Lactobacillus spec. W56</i> , HE970764, HE970765	<i>Lactobacillus casei</i> LC2W, CP002616	<i>Lactobacillus casei</i> , AB008205	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , AB008211	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , AB626049
<i>Lactobacillus pantheris</i> , AF413523	100%										
<i>Lactobacillus thailandensis</i> , AB257863	98,6%	100%									
<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC2530, ACGY01000162	93,0%	92,1%	100%								
<i>Lactobacillus casei</i> , ATCC334, CP000423	93,1%	91,9%	100%	100%							
<i>Lactobacillus paracasei</i> , AY369076	93,1%	92,1%	100%	100%	100%						
<i>Lactobacillus casei</i> , BD-II, CP002618	92,9%	92,0%	99,9%	99,9%	99,9%	100%					
<i>Lactobacillus spec. W56</i> , HE970764, HE970765	92,8%	92,0%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	100%				
<i>Lactobacillus casei</i> LC2W, CP002616	92,9%	92,0%	99,9%	99,9%	99,9%	100%	99,9%	100%			
<i>Lactobacillus casei</i> , AB008205	93,1%	92,2%	99,9%	99,8%	99,8%	99,8%	99,7%	99,8%	100%		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , AB008211	93,0%	92,0%	99,0%	98,9%	98,9%	98,9%	98,8%	98,9%	98,9%	100%	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , AB626049	92,7%	92,1%	98,9%	98,9%	98,9%	98,8%	98,7%	98,8%	98,8%	100%	100%

Abb. C.14 Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS von *L. casei* W56 mit seinen nächsten Verwandten

	<i>Lactobacillus casei</i> , AB008205	<i>Lactobacillus</i> sp. remanqily10, AY363376	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , HM218363	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , JQ621982	<i>Lactobacillus spec. W102</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , FJ409226	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , EU483093	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , AB626049	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , AB626049	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, FM179322	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 8530, CP003094	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lc, FM179323	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, AP011548	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , EU184020
<i>Lactobacillus casei</i> , AB008205	100%													
<i>Lactobacillus</i> sp. remanqily10, AY363376	98,8%	100%												
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , HM218363	98,9%	99,9%	100%											
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , JQ621982	98,8%	99,9%	100%	100%										
<i>Lactobacillus spec. W102</i>	98,8%	99,9%	100%	100%	100%									
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , FJ409226	98,6%	99,7%	99,8%	99,8%	99,8%	100%								
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , EU483093	98,9%	99,9%	100%	100%	100%	99,8%	100%							
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , AB626049	98,8%	99,8%	100%	100%	100%	99,8%	100%	100%						
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , AB626049	98,9%	99,9%	100%	100%	100%	99,8%	100%	100%	100%					
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, FM179322	98,8%	99,9%	100%	100%	100%	99,8%	100%	99,9%	100%	100%				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 8530, CP003094	98,8%	99,9%	100%	100%	100%	99,8%	100%	99,9%	100%	100%	100%			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lc, FM179323	98,8%	99,9%	100%	100%	100%	99,8%	100%	99,9%	100%	100%	100%	100%		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, AP011548	98,8%	99,9%	100%	100%	100%	99,8%	100%	99,9%	100%	100%	100%	100%	100%	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , EU184020	98,7%	99,8%	99,9%	99,9%	99,9%	99,7%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	100%

Abb. C.15 Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS von *L. rhamnosus* W102 mit seinen nächsten Verwandten

	<i>Lactobacillus spec. W56</i> HE970764, HE970765	<i>Lactobacillus spec. W102</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, AP011548
<i>Lactobacillus spec. W56</i> HE970764, HE970765	100%		
<i>Lactobacillus spec. W102</i>	98,8%	100%	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, AP011548	98,8%	100%	100%

Abb. C.16 Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS der Stämme *L. rhamnosus* GG, W102 und W56 untereinander.

C.4.2 DNS-Libraries

Als nächster Schritt war es nun notwendig die Genomsequenzen der ausgewählten Bakterien zu kennen. Für die Sequenzierung mit dem 454-Pyrosequenzierung-System war das Erstellen einer DNS-Library der genomischen DNS als Vorbereitung nötig (B.2.3.4). Für jeden der beiden Stämme, *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102, wurde eine eigene Library aus isolierter DNS angefertigt. Zur Überprüfung der Qualität dieser Libraries wurden die Längenverteilungen der erhaltenen Fragmente mit dem Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA Chip ermittelt. Beide Libraries lagen, wie aus Abb. C.17 ersichtlich, in einem guten Längenbereich von etwa 500 bis 1500 bp, wobei das Maximum der Längenverteilung um 750 bp lag.

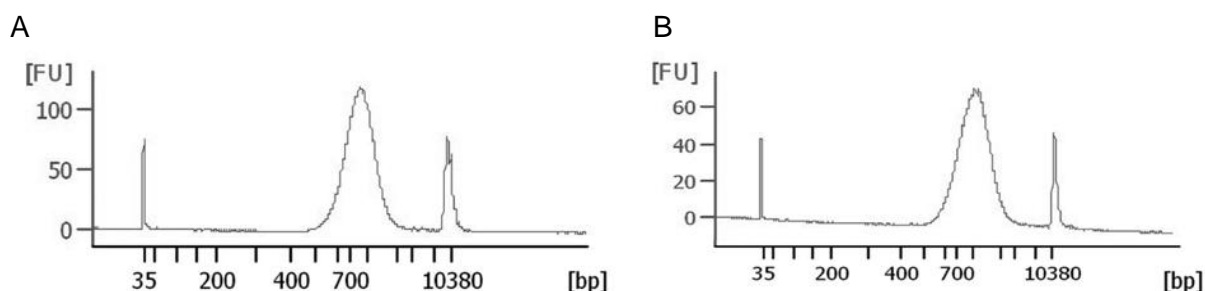


Abb. C.17 Längenverteilung der DNS-Fragmente in den Libraries. A für W56, B für W102.
FU= Fluorescenceunits

Auf die Qualitätsprüfung folgte die Quantifizierung mit einem Quantifluor™ST Fluorometer. Die dafür angefertigten Standardgeraden sind in Abb. C.18 dargestellt. Die zugehörigen Messwerte wurden durch Verdünnen und Messen einer Standard-DNS mit bekannter Moleküle/µl-Konzentration erhalten. Die Menge an Molekülen in den Libraries errechnete sich dann aus den zu den Standardgeraden gehörenden Gleichungen:

$$L. casei W56: \quad y = (1E+07)x + (3E+06)$$

$$L. rhamnosus W102: \quad y = (7E+06)x + (2E+08)$$

Wobei y der Konzentration der Library in Molekülen/µl entsprach und x die gemessene Fluoreszenzintensität war. Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt bei einer linearen Abhängigkeit wie sie hier vorliegt idealerweise bei 1. Es ist kennzeichnend dafür, wie gut die experimentell erhaltenen Daten mit der linearen Ausgleichsgeraden übereinstimmen.

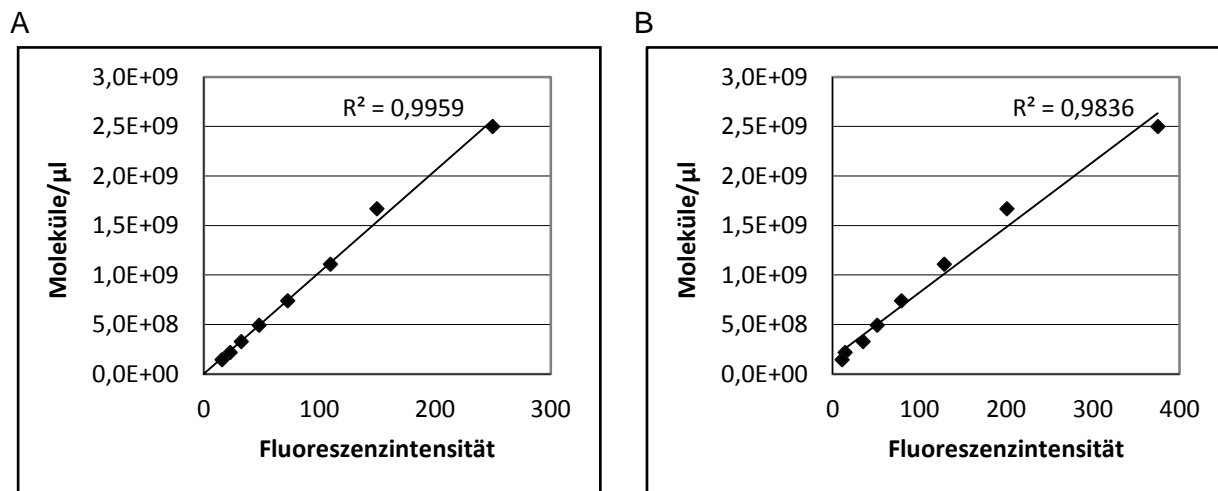


Abb. C.18 Standardgeraden für die Quantifizierung der DNS-Libraries. Für jeden Messtag wurde eine eigene Gerade erstellt. Anhand der Fluoreszenzintensität kann die Konzentration an Molekülen/µl errechnet werden. A für *L. casei* W56, B für *L. rhamnosus* W102.

Mit diesen Gleichungen ließen sich, unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung, die in Tabelle C-4 angegebenen Konzentrationen anhand ihres Fluoreszenzwertes berechnen. Diese wurden für die Bestimmung des Volumens an DNS-Library, das in die anschließende Sequenzierung eingesetzt werden musste, benötigt.

Tabelle C-4 Fluoreszenzwerte und Konzentrationen der Libraries

	Fluoreszenzwert	Verdünnung	Moleküle/µl
<i>L. casei</i> W56	64,55	keine	6,49E+08
<i>L. rhamnosus</i> W102	121,2	1/2	2,10E+09

C.4.3 454-Pyrosequenzierung

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Sequenzierung zusammengefasst. Für eine erfolgreiche Sequenzierung war es nötig das optimale Verhältnis zwischen DNS-Molekülen und Beads vorab zu titrieren. Von diesem Verhältnis hängt der Prozentsatz an angereicherten Beads ab, die am Ende erhalten werden und in die Sequenzierung eingesetzt werden können. Wie bereits in B.2.3.4 beschrieben liegt das optimale Verhältnis von angereicherten Beads zur Anzahl eingesetzter Beads bei 8 %. Eine Verwendung für die Sequenzierung ist zwischen 5 und 20 % möglich. Die eingesetzten Verhältnisse, der Prozentsatz an angereicherten Beads, sowie die daraus resultierende Gesamtzahl an Beads können Tabelle C-5 und Tabelle C-6 entnommen werden.

Tabelle C-5 Angereicherte Beads für *L. casei* W56

Ansatz	Eingesetztes Verhältnis	Angereicherte Beads [%]	Anzahl Ansätze	Gesamtzahl Beads
1	0,5	1,4	1	33 600
2	1	3,6	1	86 400
3	3	7,3	2	349 000
4	4	8,6	1	205 740
5	4	13,4	2	644 831

Tabelle C-6 Angereicherte Beads für *L. rhamnosus* W102

Ansatz	Eingesetztes Verhältnis	Angereicherte Beads [%]	Anzahl Ansätze	Gesamtzahl Beads
1	2	5,0	1	119 854
2	4	9,6	1	229 344
3	4	7,1	2	340 922
4	4	6,9	1	166 601

Für die Sequenzierung wurden je Genom 790.000 angereicherte Beads benötigt. Ausreichend Beads mit einem entsprechenden Verhältnis von angereicherten zu eingesetzten Beads wurden nach vier bzw. fünf Ansätzen erreicht. Für *L. casei* W56 wurden Ansatz 3 und 4 komplett verwendet und die fehlenden Beads aus Ansatz 5 aufgefüllt. Für *L. rhamnosus* W102 wurden Ansatz 2, 3 und 4 vollständig verwendet und mit Beads aus Ansatz 1 aufgefüllt (B.2.4.2), es wurde kein fünfter Ansatz benötigt.

Nach der Sequenzierung wurden die erhaltenen Sequenzen mit der Software Newbler getrimmt und in Contigs zusammengefügt (B.5.2). Die Längenverteilungen der erhaltenen Teilsequenzen sind graphisch in Abb. C.19 dargestellt, sowie der Tabelle C-7.

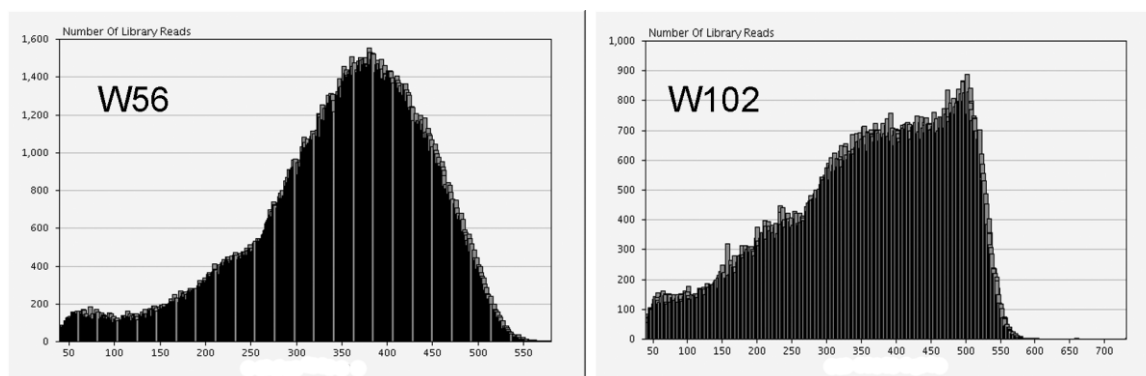


Abb. C.19 Längenverteilung der durch 454-Pyrosequenzierung erhaltenen Fragmente von *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102. Die x-Achse gibt die Länge in Basen an, die y-Achse die Anzahl an Sequenzen.

Die Längenverteilung für *L. casei* W56 lag zwischen 40 und 580 Basen, wobei ein Maximum an Reads bei etwa 380 Basen erreicht wurde. Der Hauptanteil der Reads lag zwischen 200 Basen und 500 Basen, die durchschnittliche Länge lag bei 348 bp. Für *L. rhamnosus* W102 lagen die Reads zwischen 40 Basen und 731 Basen, die meisten Sequenzfragmente lagen zwischen 150 Basen und 550 Basen und die durchschnittliche Länge der Reads betrug 357 Basen, es war jedoch kein so deutliches Maximum in der Längenverteilung zu erkennen wie für die Ergebnisse aus der Sequenzierung von *L. casei* W56.

Tabelle C-7 Statistischer Überblick über die Sequenzierungen

	W56	W102
"Raw Wells"	448.524,00	333.627,00
"Key Pass Wells"	430.835,00	306.017,00
"Passed Filter Wells"	320.156,00	235.246,00
Gesamtzahl an Basen	111.486.575,00	83.989.793,00
Längendurchschnitt	348,23	357,03
Standardabweichung der Länge	97,94	121,47
Größte Leseweite	580,00	731,00
Kürzeste Leseweite	40,00	40,00
Mittlere Leseweite	363,00	374,00

Ein vollständiges *Lactobacillus* Genom besitzt durchschnittlich etwa 3,0 Mbp. Bei den durchgeführten Sequenzierungen wurde demnach für *L. casei* W56 eine 37-fache, für *L. rhamnosus* W102 eine 28-fache Abdeckung (coverage) des gesamten Genoms erzielt.

C.4.4 Bioinformatische Auswertung der Genomsequenzierungen

Die bioinformatische Auswertung, der in C.4.4 dargestellten Sequenzierungsergebnisse, mit Newbler (B.5.2) ergab für *L. casei* W56 81 Large Contigs (> 500 bp) mit insgesamt 3,07 Mbp, die erwartete Größe wurde mit 3,5 Mbp angegeben. Mit dem Programm RAST konnten 3167 Gene vorläufig annotiert werden. Für *L. rhamnosus* W102 errechnete das Programm Newbler 94 Large Contigs mit insgesamt 2,94 Mbp und das Programm RAST automatisch annotiert 2977 Gene.

Durch die weitere Bearbeitung der Sequenzierungsergebnisse von *L. casei* W56 in Kooperation mit dem „Department für Computational Systems Biology“ der Universität Wien (B.5.3) wurde festgestellt, dass ein Teil der erhaltenen Contigs zu einem Plasmid gehören. Insgesamt konnte die Anzahl der Contigs auf vier reduziert werden. Zwei davon bilden die chromosomale DNS, die anderen beiden ein Plasmid. Für die detaillierte Annotation und die folgende Publikation des Genoms sollen die Lücken zwischen den Contigs mit Hilfe von PCR-Amplifikaten und deren darauffolgender Sangersequenzierung geschlossen werden (C.4.5).

C.4.5 Verbinden der verbliebenen Contigs aus *L. casei* W56

Die Sequenzen, die für das Genom von *L. casei* W56 codieren, wiesen nach der bioinformatischen Bearbeitung nur noch vier Lücken auf. Zwei davon liegen innerhalb der chromosomalen DNS, zwei innerhalb eines Plasmids. Um diese Lücken schließen zu können wurden spezielle Primer entworfen (B.2.3.1), die spezifisch an die Randbereiche der Contigs binden und die Sequenz in den Lücken amplifizieren. So konnten PCR-Fragmente generiert werden, die den unbekannten DNS-Bereich überspannen. Die erwartete Länge wurde an Hand des Referenzgenoms von *L. casei* BI23 grob abgeschätzt.

C.4.5.1 Zusammenführen der chromosomalen Contigs

Das erste Contig des Chromosoms weist eine Länge von 2.324.478 bp, das zweite ist mit 751.264 bp deutlich kürzer. Zwischen den Contigs 1 und 2 wurde mit den Primern W56 C1-2 F und R ein PCR-Amplifikat mit einer Länge von ca. 350 bp erwartet (Abb. C.20 links), zwischen den Contigs 2 und 1 mit den Primern W56 C2-1 F und R ein Produkt mit ca. 270 bp Länge (Abb. C.20 rechts). Diese Längen konnten anhand einer Überprüfung auf einem Agarosegel in etwa bestätigt werden (Abb. C.20).

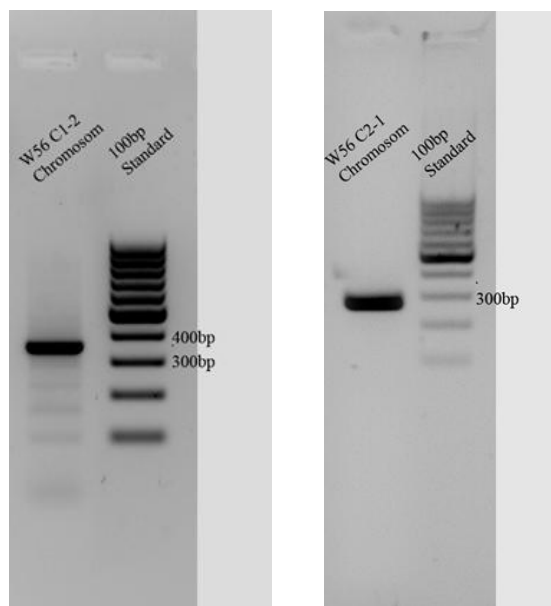


Abb. C.20 PCR-Produkte zwischen den beiden chromosomalen Contigs.

Links: Verbindung zwischen C1 und C2; rechts: Verbindung zwischen C2 und C1

Im Anschluss wurden die Sequenzen der PCR-Produkte direkt durch Sangersequenzierung erstellt. Bei der folgenden Auswertung mit dem Programm Seqman (B.5.1) konnten eindeutige Verbindungen zwischen den beiden Contigs des Chromosoms geknüpft und dieses geschlossen werden (Abb. C.21). Von beiden Überbrückungssequenzen wurden Duplikate angefertigt, um mögliche Amplifikations- und Sequenzierfehler zu erkennen.

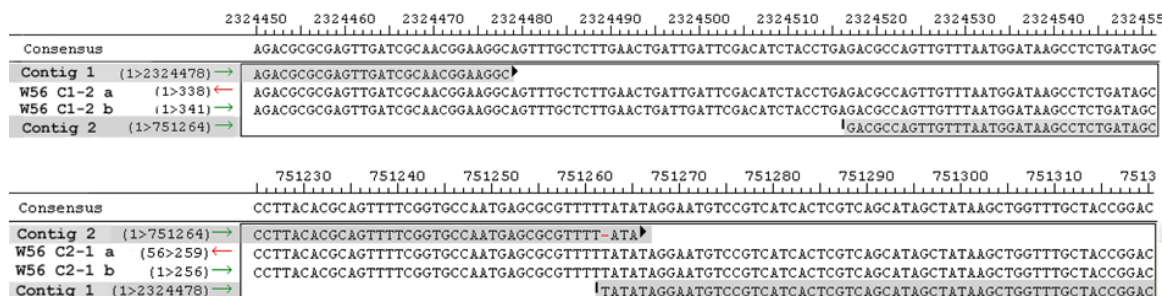


Abb. C.21 Überbrücken der fehlenden Sequenzen aus der 454-Sequenzierung mit Hilfe von PCR-Amplifikaten im Chromosom. Sequenzausschnitt im Bereich der „Lücke“. Grau unterlegt: Contigs aus der 454-Sequenzierung. Weißer Hintergrund: PCR-Amplifikate. Rote und grüne Pfeile: Orientierung der Sequenz

Das geschlossene Chromosom hatte eine Gesamtlänge von 3.075.780 bp und war nun bereit für die bioinformatische Auswertung (C.4.4).

C.4.5.2 Schließen der Lücken zwischen den Plasmid-Contigs

Ebenso wie für das Chromosom waren nach der bioinformatischen Bearbeitung für das Plasmid (P) zwei Contigs (C) übrig, die zusammengeführt werden sollten. Contig 1 hatte eine Länge von 36.911 bp, Contig 2 20.455 bp. Die Länge der erwarteten PCR-Stücke, die die Contigs verbinden sollten betrug hier ca. 1300 bp zwischen dem ersten und dem zweiten Contig mit den Primern W56 P C1-2 F und R bzw. 300 bp zwischen Contig 2 und 1 mit den Primern W56 P C2-1 F und R.

Die PCR für den Bereich zwischen Conti 2 und 1 lieferte mit den spezifischen Primern W56 P C2-1 F und R ein Fragment der erwarteten Länge von 300 bp (Abb. C.22). Dieses wurde ebenfalls als Duplikat sequenziert und somit konnte der Bereich zwischen den beiden Contigs geschlossen werden (Abb. C.23)

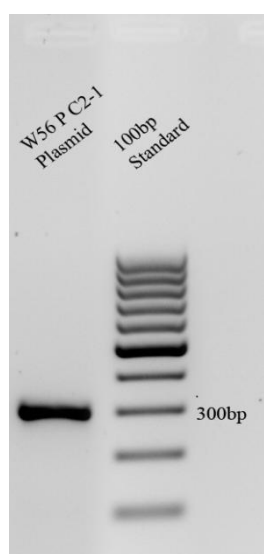


Abb. C.22 PCR für das Produkt zwischen den Contigs 2 und 1 des Plasmids.

Anhand des Standards kann die Größe auf etwa 300 bp geschätzt werden. Amplifikat mit den Primern W56 P C2-1 R und F.

	20410	20420	20430	20440	20450	20460	20470	20480	20490	20500
Consensus	ACCCAGTATACTAAATCAAGTCAGCGAGGAAAAATTGACCCAGAACCCCTTGAAACCACTCTCAAGGCACAAAAAGCCGCCACTGGCGGTACAGCAG									
Contig 2 (1>20455) →	ACCCAGTATACTAAATCAAGTCAGCGAGGAAAAATTGACCCAGAA▶									
W56 P C2-1 a (21>274) ←	ACCCAGTATACTAAATCAAGTCAGCGAGGAAAAATTGACCCAGAACCCCTTGAAACCACTCTCAAGGCACAAAAAGCCGCCA▶									
W56 P C2-1 b (1>276) →	ACCCAGTATACTAAATCAAGTCAGCGAGGAAAAATTGACCCAGAACCCCTTGAAACCACTCTCAAGGCACAAAAAGCCGCCACTGGCGGTACAGCAG									
Contig 1 (1>36911) →	!AGAACCCTTGAAACCACTCTCAAGGCACAAAAAGCCGCCACTGGCGGTACAGCAG									

Abb. C.23 Verbindung Contigs 2 und 1 in Plasmid. Sequenzausschnitt. Grau unterlegt: Contigs aus der 454-Sequenzierung. Weißer Hintergrund: PCR-Amplifikate.

Für den Bereich zwischen Contig 1 und 2 im Plasmid stellten sich die gewählten Primer W56 P C1-2 F und R als zu unspezifisch heraus, da auch durch Optimierung der Annealingtemperatur keine Einzelbande erreicht werden konnte. Daraufhin wurden die Primer W56 P 1-2b F, W56 P 2b R und W56 P 2c R entworfen und in der PCR, auch in Kombination

mit den vorher verwendeten Primern, getestet. Ihre Bindungsstellen und Orientierung sind in der folgenden Sequenz markiert. In Tabelle C-8 sind die Kombinationen der einzelnen Primer aufgelistet mit der erwarteten Länge des PCR-Produkts und der tatsächlich erhaltenen Größe der jeweils stärksten Bande, die mit Hilfe von Agarosegelen (Abb. C.24) ermittelt wurde.

Sequenzende von Contig 1 und Anfang von Contig 2. Die Bindepositionen der Vorwärtsprimer sind **grün** markiert, die der Rückwärtsprimer **violett**. Die **blauen**, kursiven Bereiche wurden anhand des Referenzplasmids BL23 vermutet, konnten jedoch mit Hilfe der PCR nicht bestätigt werden.

.....GAACAACCTGCACGTTATCACATTGGCCGAGAGTTTGGGTGCACTGGAAAGCTTGATCGAAATTCGGGCCCTTGATG
 ACCCACGGCTCAATTCCACGTGACATTTCGGTTGAAAAACGGAATCAAAGACGAGTTAATTCGCCTTTCAGTCGGCGTTGA
 AGATCAAAAGGATTTGTTAGCCGATTTGGAACGCGGCTTCAATGAGCTTAAGAGGAGCAAGAAAAATGTTTCAGACAGCA
 AGGTCCATTCTCAAGCGTGATCCGGCAGCCACAGTCTTTTAGAAGTTCTCTTAACCTACCCGGGGATTTCGGGCCCTGTT
 TTGGTACCGAATCGCTCACTTTATGGCTTTTCATCGACTTTATACAATTGCCCCGGTTCCCTAAGTCAACATGCCGCCAAAG

W56 P C1-2 F →

TAACCGGGATTTCATTTTCGCCGAAGCCAAAATCGGTAAGCGCGTTTTTATCGATCACGGGATTGGCGTTGTGATCGGT
 GCCACTGCCGTGATTGAAGATGACGTCACTATCCTGCATGGCGTGACGCTGGGTGCCAGGAGGCCGTTGAAGGTCGGCG
 ACATCCCTATGTAAAAAAGGTGCATTTCATTGGTGCCAACGCCCAATTGCTTGGCACCATTACGATCGGCGCCTTTAGTA
 AAGTTGGCGCAGGGGCAATTGTCTGAATAACGTGGCCGATAAAACCACAGTGGTCGGCAACCTGCCCGAACCGTTAAC
 AAGTTACCGCTAAAGTCATTAACGTGACCTTCACGACAAACACGTCACCACTAAAAATTAATAACTTACGAAAAACAC

W56 P C1-2b F →

CTTGATGAAAAGAGTTGCCAGTTGGCAAAAATATCATCAAGTGTTTTTTCGTATTTAACTATTGTGTGCAAAAATAATTAG
 AACCTGTCTAGTATCTGCTGAATCTGGTAGAATTGTGGAAAACCGACTGAGGAGTTTGTTCATGCCAGATTATCCAAGCAA
 TATTTCTCGAGCGCAATTTGCGTTAATACAACCTGATTTAGAAAACCTTCGCAAGCATAACAAGACCGCGTCGTTATGATC
 TTTATGACGTATTCAATGCCATCCTTTACTCGCTTACTACAGGGTGTCAATGGCGTGAATTACCGCAGCATTTCCCGGAA
 TGGCACACTGTCTACCGCTATTACGATATGTGGCGAGATAAACCAGACCCGACAGCTGATTCGCTATTAGAAAGGCTTTT
 AAAAAAAGTGTGCTTCCTATCGCTTTGCACAGGGCCGATCGGCCCAACGTCGTTTGTGATTGTTGATGCTCAAAGTGT
 TAAAACCACTGATTTAACGAAAAATAGTGGCTACGATGGCGGCAAAAAGATTTTCAGAGATTAAGCGTCATATGGCGGTTG
 ATATTAACGGTTTACCACAAGCCATTCTCGTGACACGAGCTAATGTATCAGATCGTTCAGGTGCATTGGCTATGTTTAGT
 TTGGCTAG..... (Ende Contig1)

(Anfang Contig2)

.....CTAGCCAAACTAAGCATAGCCAATGCACCTGAACGATCTGATACATTAGCTCGTGTCACGAGAATGGCTTGTGGT
 AAACCGTTAATATCAACCGCCATATGACGCTTAATCTCTGAAATCTTTTTGCGCCATCGTAGCCACTATTTTCGTTAA
 ATCAGTGGTTTTAACACTTTGAGCATCAATAATCACAACGACGTTCCGGCCGATCGGCCCTGTGCAAAACGATAGGAAG
 CGACAGTTTTTTTTAAAGCCTTTCTAATAGCGAATCAGCTGTGCGGTCTGGTTTATCTCGCCACATATCGTAATAGCGGT
 AGACAGTGTGCCATTCTGGGAAATCGTGCGGTAATTCACGCCATTGACACCCGTAGTAAGCGAGTAAAGGATGGCATTG
 AATACGTCATAAAGATCATAACGACGCGGTCTTGTATGCTTGCAGGAAGTTTCTAAATCAGGTTGTATTAACGCAAATTG
 CGCTCGAGAAATATTGCTTGGATAATCTGGCATGACAACTCCTCAGTCGGTTTTCCACAATTCTACCAGATTCAGCAGA
 TACTAGACAGGTTCTTAAAGAGTTGCTTTCAATTGATCTAATCGCCATTGGCACCATGAAATAAAGGCTAATTCGTCAAT
 CTTTGGAAATGCCATAGGTTCTAGCATACGTTAACTTTTGAGTGGTAAGTAGTTGATCATAGGGTTTGCTAATAATACCAA

← W56 P 2c

CCACAAGGATATCGACATTTTTGTCAATCCCGTTGACAGTTTTTGCTCCTAGAATAGTTGCTAACTGTTGTGCCTGGAAA

← W56 P 2b R

CGACGAAAAGATCGCAAACGGCCGGTAAAGAGAATTCGTTTGGCCCTTAAATCTATCATGATATTTACCTCTCACTACGA
 GGAACATTTGCTAGATCTTCTGCCTGATACTTTTCGATGCGATATAAGGTTACTGGTGCAATACCTAACATCGGGCAAT
 TTGTC.....

Tabelle C-8 Vergleich der erwarteten und erhaltenen Fragmentlängen aus der PCR im Bereich der Verbindung zwischen Contig 1 und 2

F	R	erwartet	erhalten
W56 P 1-2F	W56 P 2b R	1880 bp	850 bp
W56 P 1-2F	W56 P 2c R	1730 bp	700 bp
W56 P 1-2b F	W56 P 2b R	1500 bp	500 bp

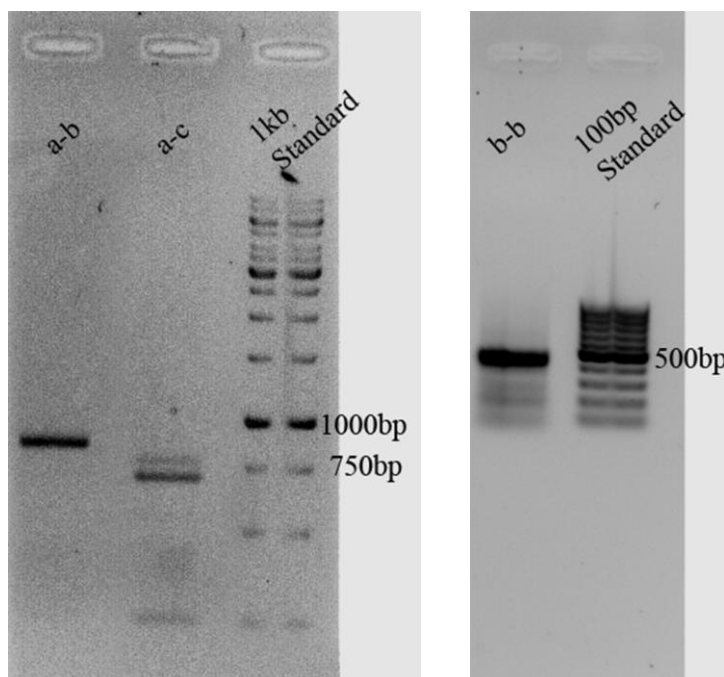


Abb. C.24 PCR-Amplifikate für den Bereich zwischen Contig 1 und 2 im Plasmid. Die Buchstaben beziehen sich auf den verwendeten Forward bzw. Reverse Primer (vgl. Tabelle C-8)

Dabei fiel auf, dass alle PCR-Produkte um etwa 1000 bp kürzer waren als zunächst erwartet. Diese Produkte der Primerpaare W56 P 1-2 F und W56 P 2b R bzw. W56 P 2c R wurden daraufhin aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in den pSC-A-Vektor kloniert. Dieser Schritt war nötig, da es nicht möglich war, Nebenprodukte, die während der PCR schwächer amplifiziert wurden, durch Optimierung gänzlich zu verhindern. Durch die Klonierung und anschließende Plasmidisolierung wurden die Sequenzen mit der gewünschten Länge von den Nebenprodukten getrennt amplifiziert.

Mit diesen Sequenzen konnten die beiden aus den 454-Sequenzierungen stammenden Contigs verbunden werden. Demnach enthält das Referenzplasmid von BI23 einen 1026 bp DNS-Abschnitt, der im Plasmid von *L. casei* W56 nicht enthalten ist. Die Plasmid-Contigs wurden jeweils mit den Sequenzen der PCR-Produkte abgeglichen. Die Bereiche der Contigs, die nicht mit den Sequenzen der PCR-Produkte übereinstimmten, wurden entfernt. Am Ende

von Contig 1 wurden 541 und am Anfang von Contig 2 wurden 485 bp entfernt. Dies zeigte, dass an den beiden Contig-Enden eine Übereinstimmung von sieben Basen bestand (Abb. C.25). Eine Blast-Suche dieser Sequenz aus dem Referenzplasmid ergab, dass es sich hierbei vermutlich um eine Transposase handelt.

		36320	36330	36340	36350	36360	36370	36380	36390	36400	36410	36420
Consensus		GTATTTAACTATTGTGTCGAAAAATAATTAGAACCTGTCTAGTATCTGCTGAATCTGGCATGACAGACTCCTCAGTCGGTTTTCCACAATTCTACCAGATTCAGCAGA										
Contig 1	(1>36370)	GTATTTAACTATTGTGTCGAAAAATAATTAGAACCTGTCTAGTATCTGCTGAATCTGGCATGACAGACTCCTCAGTCGGTTTTCCACAATTCTACCAGATTCAGCAGA										
W56 P C1-2 a	(62>762)	GTATTTAACTATTGTGTCGAAAAATAATTAGAACCTGTCTAGTATCTGCTGAATCTGGCATGACAGACTCCTCAGTCGGTTTTCCACAATTCTACCAGATTCAGCAGA										
W56 P C1-2 b	(64>785)	GTATTTAACTATTGTGTCGAAAAATAATTAGAACCTGTCTAGTATCTGCTGAATCTGGCATGACAGACTCCTCAGTCGGTTTTCCACAATTCTACCAGATTCAGCAGA										
W56 P C1-2 c	(203>786)	GTATTTAACTATTGTGTCGAAAAATAATTAGAACCTGTCTAGTATCTGCTGAATCTGGCATGACAGACTCCTCAGTCGGTTTTCCACAATTCTACCAGATTCAGCAGA										
Contig 2	(486>20442)	GTATTTAACTATTGTGTCGAAAAATAATTAGAACCTGTCTAGTATCTGCTGAATCTGGCATGACAGACTCCTCAGTCGGTTTTCCACAATTCTACCAGATTCAGCAGA										

Abb. C.25 Verbindung Contigs 1 und 2 im Plasmid nach Bearbeiten der Enden. Sequenzausschnitt. Grau unterlegt: Contigs aus der 454-Sequenzierung. Weißer Hintergrund: PCR-Amplifikate.

C.4.6 Überprüfen der Positionen und Richtungen der Transposons

Für die Publikation der vollständigen Sequenz von *L. casei* W56 war neben dem Schließen der Sequenzen, auch eine Überprüfung der Transposonelemente notwendig. Transposons gehören zu den mobilen genetischen Elementen (Schlegel *et al.*, 1992). Sie können mehrfach in einem Genom vorkommen und sind auch in nahe verwandten Organismen an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Sequenz zu finden. Daher bereiten sie „Mapping“-Programmen wie dem hier verwendeten AMOScmp Schwierigkeiten, beim Vergleich der Contigs mit einem Referenzgenom. Ob die Transposons im Genom von *L. casei* W56 tatsächlich an den zuvor abgeschätzten Stellen liegen, wurde durch PCR überprüft.

In Tabelle C-9 sind die fünf Stellen aufgelistet, an denen ein Transposon erwartet wurde. Für jede dieser Stellen wurden spezifische Primer (R+F) designt, die jeweils diese Region umspannen. Der R-Primer ist dabei komplementär zum kodierenden Strang und bindet an diesen. Der F-Primer hingegen hat dieselbe Sequenz wie der kodierende Strang und bindet daher an den Matrizenstrang. Damit kann auf das grundsätzliche Vorhandensein des Transposons an dieser Stelle getestet werden. Zusätzlich wurden der Forward- und der Revers-Primer noch getrennt mit dem Primer W56 Transp-F (Primer T) getestet (Abb. C.27). Dieser bindet innerhalb der Transposonsequenz. Mit diesen Ansätzen kann die Richtung des Transposons bestimmt werden, je nachdem, ob der Primer W56 Transp-F mit dem für die Region spezifischen Primer R oder F ein Amplifikat bildet (Abb. C.26).

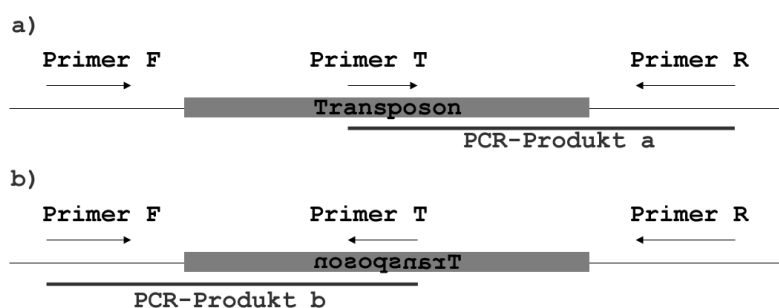


Abb. C.26 Schematische Darstellung der Strategie zur Bestimmung der Position und Orientierung der Transposons. Der Primer W56 Transp-F (Primer T), der innerhalb des Transposons bindet, kann je nach Richtung des Transposons nur mit dem Vorwärts- oder Rückwärtsprimer (Primer R und F) ein PCR-Produkt bilden.

Alle Transposons konnten mit dieser Methode bestätigt werden, ebenso die jeweilige Orientierung der Sequenz. Für das Transposon T4 konnte mit den Primern R und F, auf Grund der geringen Schmelztemperatur des Primers W56 T4 R, im ersten Versuch kein Produkt amplifiziert werden. Anhand einer Gradienten-PCR konnte aber auch für dieses Primer-Paar eine Annealingtemperatur gefunden werden die spezifisch ein Fragment generiert (Abbildung nicht gezeigt).

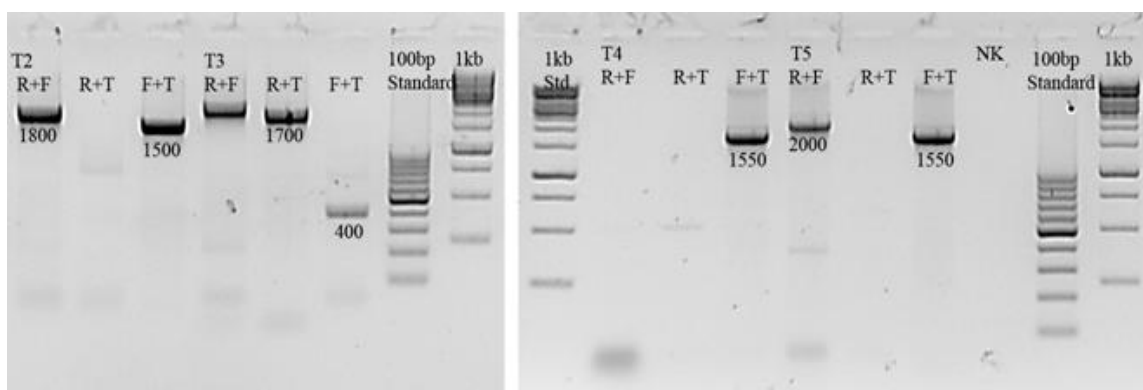


Abb. C.27 PCR-Produkte im Bereich der Transposons zwei bis fünf (T2-T5). T1 ist nicht abgebildet.

Tabelle C-9 Übersicht über die Transposons in *L. casei* W56.

Transposon	Position (bp)	Erwartete Länge	Erhaltene Länge	Produkt mit T
T1	298.805 - 300.415	1973bp	~1850bp	Primer R
T2	35.126 - 36.736	1914bp	~1800bp	Primer F
T3	48.594 - 50.168	2128bp	~2000bp	Primer R
T4	132.532 - 134.099	2135bp	~2000bp	Primer F
T5	2.152.331 - 2.153.894	2109bp	~2000bp	Primer F

Nachdem die Sequenzen geschlossen waren und die Position und Orientierung der Transposon aufgeklärt war, wurde die Sequenz des Stammes *L. casei* W56 allgemein zugänglich gemacht. Dazu wurde das vollständige Genom bei EMBL unter der Accession Number HE970764 und das Plasmid unter HE970765 hinterlegt. Das Chromosom besteht aus 3,075,780 bp mit einem GC-Gehalt von 46,3 % und das Plasmid aus weiteren 56,316 bp, deren GC-Gehalt bei 43,7 % liegt. Die ausführliche Annotation ergab 39,098 codierende Sequenzbereiche und 60 Gene für tRNA. Zusätzlich liegen je fünf Kopien kodierender ribosomaler Operons für 5S-, 16S- und 23S-rRNA vor.

C.4.7 Vergleich der Racemasen in den Sequenzen von *L. rhamnosus* GG, *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102

Der Vergleich der DNS sollte zudem Unterschiede zwischen dem Tryptophan produzierenden Stamm *L. casei* W56 und dem nichtproduzierenden Stamm *L. rhamnosus* W102 im Hinblick auf ein geeignetes Zielgen für den anschließenden Knock-Out bringen. Da *L. rhamnosus* GG ebenfalls D-Trp produziert, wurden Racemasen betrachtet, die bereits aus *L. rhamnosus* GG bekannt sind. Bisher sind fünf Racemasen in *L. rhamnosus* GG annotiert (Morita *et al.*, 2009):

- | | |
|-----------------------------|-------------|
| - Aspartat Racemase | <i>racD</i> |
| - Aminosäure Racemase | <i>yhfX</i> |
| - N-acylaminosäure Racemase | <i>menC</i> |
| - Glutamat Racemase | <i>murl</i> |
| - Alanine Racemase | <i>alr</i> |

Alr und *murl* finden sich in allen Gram-positiven Bakterien (Walsh, 1989), da sie für den Aufbau der Interpeptidbrücken bei der Zellwandbildung nötig sind. Jedoch könnten sich diese Gene in der Spezifität ihrer aktiven Zentren unterscheiden.

Die nun annotierten Genome von *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102 wurden auf das Vorhandensein von Genen mit hoher Ähnlichkeit zu den Racemasen aus *L. rhamnosus* GG hin überprüft. Es konnten *racD*, *murl* und *alr* gefunden werden, jedoch konnte keines dieser Gene ausschließlich in *L. casei* W56 detektiert werden.

C.5 Generierung einer Knock-Out-Mutante des Gens *trpC* in *L. casei* W56

Zur Aufklärung des Biosynthesewegs von D-Trp sollten gezielte Knock-Out-Mutanten generiert werden. Grundsätzlich könnte D-Trp entweder durch Umwandlung von bereits vorhandenem L-Trp oder durch *de-novo*-Synthese gebildet werden. Eine umfangreiche Literatur- und Datenbank-Recherche ergab mehrere Gene, die zur *de-novo*-Synthese von D-Trp bzw. Konversion von L-Trp in Frage kommen. Für eine Umwandlung von L- in D-Trp ist eine Racemase notwendig (vgl. C.4.7). Im Gegensatz dazu, könnte ein alternativer Weg über das Enzym Indol-3-Phosphat-Dehydrogenase (*trpC*) D-Trp *de novo* synthetisieren (Yamamoto *et al.*, 1999 und persönliche Kommunikation mit Thorsten Schmitt, Institut für Bioinformatik und Systembiologie, Helmholtz Zentrum München). *TrpC* ist allerdings auch zur Synthese von L-Trp nötig und daher ebenfalls in Bakterien vorhanden, die kein D-Trp produzieren.

Da der Vergleich auf DNS-Ebene zwischen einem D-Trp produzierenden Stamm und einem nicht-produzierenden Stamm keine Einschränkung hinsichtlich der Racemasen erbrachte (C.4.7), wurde *trpC* als erstes Zielgen für das Setzen einer Mutation ausgewählt.

Die Mutation sollte dabei über homologe Rekombination erfolgen. Bei dieser Technik wird eine zu einem Teil des Gens homologe Sequenz in ein Plasmid kloniert, sie beinhaltet jedoch bereits eine Mutation, in diesem Fall ein Gen für eine Antibiotikaresistenz. Durch zwei zufällige, aufeinanderfolgende Crossing-Over-Ereignisse wird das Zielgen mit der mutierten Variante aus dem Plasmid ausgetauscht.

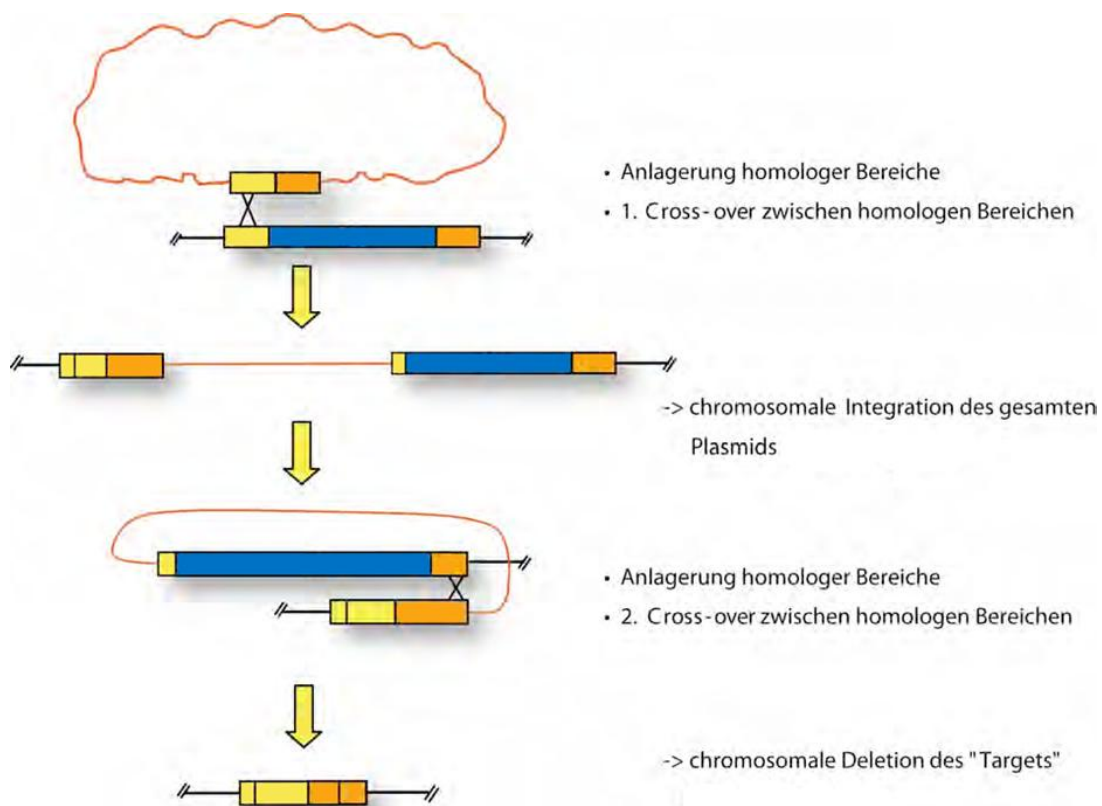


Abb. C.28 Schematische Darstellung der Knock-Out-Mutagenese mittels homologer Rekombination (Steinbüchel *et al.*, 2005).

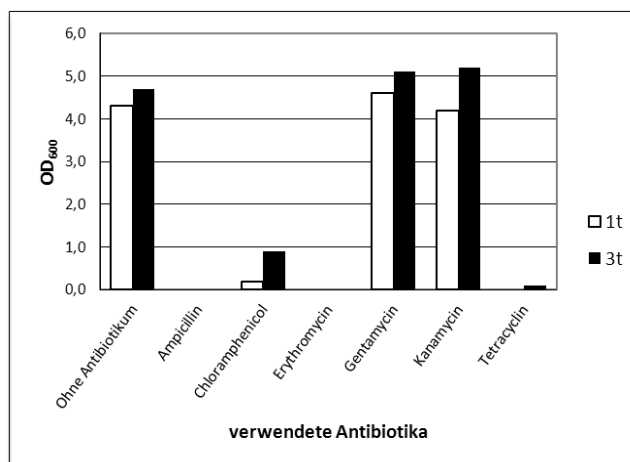
C.5.1 Auswahl geeigneter Antibiotika als Selektionsmarker für die Mutanten

Die spätere Selektierung der Mutanten erfolgt über Antibiotikaresistenzen, die auf dem Vektor enthalten sind. Dazu ist vorab zu klären welche Resistenzen der Wildtyp (WT) von *L. casei* W56 besitzt.

Die verschiedenen Antibiotika wurden sowohl in Flüssigkultur, als auch auf Platte getestet. Nach drei Tagen konnte auf den Nährmedienplatten die Erythromycin (Ery), Ampicillin (Ap) oder Tetracyclin (Tc) enthielten (B.1.2) kein Wachstum festgestellt werden. Dagegen zeigten sich Resistenzen gegen Chloramphenicol, Kanamycin und Gentamycin. Die Ergebnisse der Wachstumshemmung in Flüssigkultur sind in Tabelle C-10 dargestellt.

Tabelle C-10 und Abb. Untersuchung der Antibiotikaresistenzen von *L. casei* W56 in Flüssigkultur. Messung der OD_{600} nach einem Tag (weiß) und drei (schwarz) Tagen.

Antibiotika	OD_{600}	
	1t	3t
Ohne	4,3	4,7
Ampicillin	0,0	0,0
Chloramphenicol	0,2	0,9
Erythromycin	0,0	0,0
Gentamycin	4,6	5,1
Kanamycin	4,2	5,2
Tetracyclin	0,0	0,1



Sowohl die Ergebnisse mit Nährböden, als auch die Versuche mit Flüssigkulturen zeigten, dass Ampicillin, Erythromycin und Tetracyclin als Selektionsmarker geeignet sind. Da für Ampicillin und Erythromycin in den zur Verfügung stehenden Vektoren bereits Resistenzgene enthalten sind, wurden die beiden Antibiotika ausgeschlossen und Tetracyclin als Selektionsmarker für das Insert gewählt.

C.5.2 Bestimmung der maximalen Wachstumstemperatur von *L. casei* W56

Wie in B.3 bereits erwähnt werden die Transformanten die lediglich das Plasmid pGh9 aufgenommen haben von denjenigen, bei denen das erste homologe Rekombinationsereignis stattgefunden hat und damit das Plasmid in das Genom integriert wurde, durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur getrennt. Dafür ist es vorab wichtig die maximale Temperatur zu bestimmen bei der *L. casei* W56 wachsen kann. Aus Abb. C.29 ist ersichtlich, dass die Zellen bei 44 °C noch wachsen, wenn auch im Vergleich zur optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C deutlich langsamer. Bei 48 °C ist auch nach drei Tagen keine Zunahme der OD festzustellen. Dasselbe gilt für 46 °C (Ergebnis nicht abgebildet).

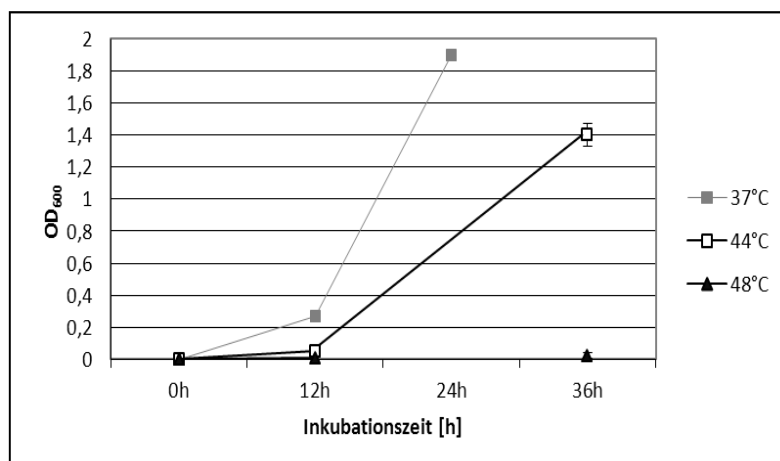


Abb. C.29 Wachstum *L. casei* W56 bei verschiedenen Temperaturen

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde eine maximale Wachstumstemperatur von 44 °C für die Versuche in C.5.4 gewählt.

C.5.3 Elektrotransformation von *L. casei* W56 mit dem Plasmid pGh9

Als nächstes wurde überprüft, ob das Plasmid pGh9 nach Elektrotransformation in *L. casei* W56 stabil aufgenommen wird. Dieses Plasmid dient später, neben pEX18Ap, als Vektor für die Insertionskassette.

Für diesen Vorversuch wurde pGh9 ohne Insert verwendet. Nur Kolonien, die das Plasmid aufgenommen haben können eine Erythromycin-Resistenz entwickeln. Die nach der Transformation auf Erythromycin-Platten gewachsenen Kolonien wurden zusätzlich noch mit Hilfe einer Kolonie-PCR mit den Primern pGh9 01 F und pGh9 02 R überprüft. Wie Abb. C.30 zeigt liefert die Kolonie-PCR der Klonen (Klon), eine Bande derselben Größe wie das reine Plasmid (pGh9). Die isolierte DNS aus dem *L. casei* W56 WT hingegen liefert keine Bande (DNA W56).

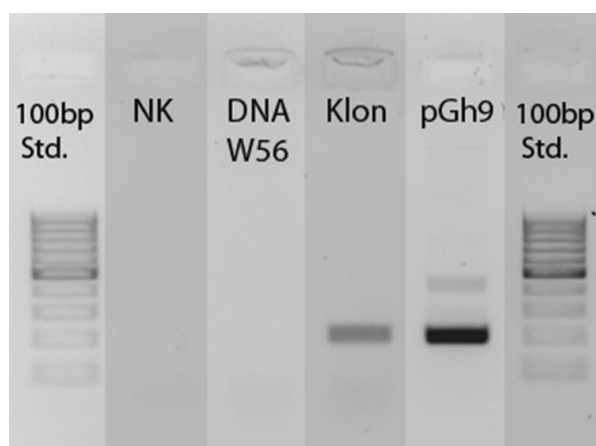


Abb. C.30 Kolonie-PCR pGh9 zur Überprüfung der Transformation. NK: Wasser; DNA W56: DNS des WT W56; Klon: Nach Transformation Ery-resistente Kolonie W56; pGh9: Gereinigtes Plasmid

Damit wurde gezeigt, dass das Plasmid pGh9 durch Elektrottransformation mit den gewählten Parametern von *L. casei* W56 aufgenommen werden kann.

C.5.4 Verlust des Plasmids pGh9 aus *L. casei* W56 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Wie oben erwähnt ist eines der Mittel, die später zur Selektion der Knock-Out-Mutante angewendet wird, die Temperatursensitivität von pGh9. Diese Eigenschaft führt bei erhöhten Wachstumstemperaturen dazu, dass das Plasmid nicht weiter repliziert wird und ist in dem Replikationsursprung *repA* begründet. Dadurch wird das aufgenommene Plasmid nicht an die Tochterzellen weitergegeben, ist somit nicht stabil in den Zellen und wird nach mehreren Generationen wieder „verloren“. Es sei denn, eine Integration ins Genom ist erfolgt, was jedoch das Vorhandensein einer zum Genom der Wirtszelle homologen Region auf dem Plasmid für ein Crossing-Over voraussetzt. Um diese Temperatursensitivität des Plasmids pGh9 bei *L. casei* W56 zu bestätigen, wurde die Anzahl an erythromycinresistenten Zellen über die Zeit protokolliert (B.3). Hierbei wurden Kolonien verglichen die bei 30 °C und 44 °C inkubiert wurden.

Wie in Abb. C.31 zu sehen ist, nimmt der Prozentsatz an resistenten Zellen bei der höheren Temperatur über die Zeit ab, wohingegen er bei 30 °C Inkubationstemperatur annähernd konstant blieb. Nach 20 h waren bei 30 °C noch ca. 95 % der Zellen resistent und tragen demnach das Plasmid pGh9. Bei 44 °C dagegen waren nur noch 11 % resistente Zellen übrig. Diese Ergebnisse waren wichtig für die im späteren Verlauf der Experimente folgende Selektion der Mutanten.

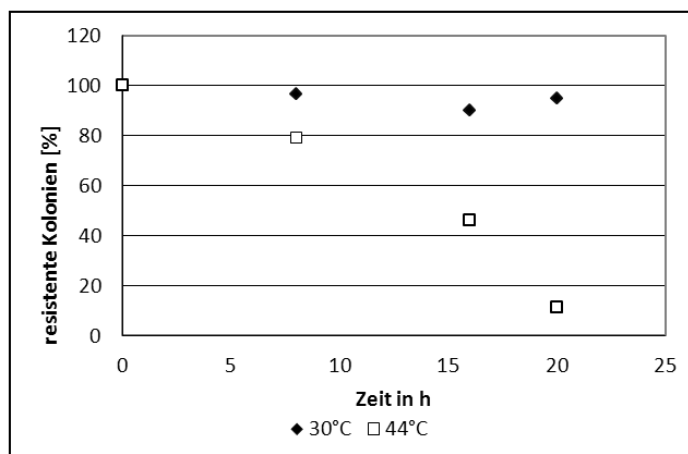


Abb. C.31 Verlust des Plasmids *pGh9* und damit der Ery-Resistenz in *L. casei* W56 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.

C.5.5 Konstruktion geeigneter Plasmide für die homologe Rekombination

Der nächste Schritt umfasste die Konstruktion einer Insertionskassette und den Einbau in die Zielvektoren *pGh9* und *pEX18Ap*. Das Insert sollte aus einer, zu einem Teilstück des Gens *trpC* aus *L. casei* W56, homologen Sequenz bestehen, die durch ein Gen für Tetracyclin-Resistenz unterbrochen wird. Dadurch sollte nach der homologen Rekombination in *L. casei* W56 das *trpC* Gen durch das Gen für die Tetracyclinresistenz unterbrochen werden und damit seine Funktionalität verlieren.

C.5.5.1 Amplifikation der zu *trpC* homologen Region und Klonierung in *pSC-A*

Die homologe Region (*trpC* hom) wurde mit Hilfe der Primer W56trpC Sall-F und -R aus isolierter DNS von *L. casei* W56 amplifiziert. Sie umfasst 533 bp des insgesamt 783 bp langen Gens.

Das Amplifikat wurde zunächst in das Plasmid *pSCA* über TA-Klonierung aufgenommen (B.2.3.5). Mit Kolonie-PCR (B.2.3.2) und den oben genannten Primern, sowie den Primern M13 wurde ein Klon für die weitere Bearbeitung des Plasmids ausgewählt. Da die Primer W56trpC Sall je 9 bp Überhang haben, ist das Produkt aus der Kolonie PCR 551 bp lang. Das Produkt mit den M13 Primern hat laut der Sequenzinformationen eine Länge von 830 bp. Beide Amplifikate aus der Kolonie-PCR entsprachen der berechneten Länge für die Kolonien 1, 2, 3 und 5 (Abb. C.32). Zur weiteren Bearbeitung wurde Klon 1 gewählt. Mit ihm wurde das neu entstandene Plasmid (*pSCA-trpC*) vervielfältigt und anschließend isoliert.



Abb. C.32 Überprüfung der Klonierung von *trpC hom* in *pSCA*.

Die Kolonien 1-5 wurden mit Hilfe zweier unabhängiger Kolonie-PCRs überprüft. In der linken Hälfte wurden die Ergebnisse mit den Primern M13 aufgetragen, rechts wurden die Primer W56trpC Sall verwendet. Als Negativkontrolle wurde H₂O eingesetzt.

C.5.5.2 Einführung der Tetracyclinresistenz in die Insertionskassette

Die Einführung des Tetracyclinresistenz-Gens wurde mit Hilfe des Transposons Tn5 durchgeführt (B.2.6). Zur Überprüfung, welche der Tetracyclinresistenten-Klone das Resistenzgen innerhalb von *trpC hom* aufgenommen haben, wurden die, die „multiple cloning site“ flankierenden Primer T3 und T7 verwendet. Ohne die Transposonsequenz wird mit diesen Primern ein Produkt mit einer Länge von 729 bp gebildet, das *trpC hom* beinhaltet. Wurde das Transposon innerhalb dieses Bereichs eingebaut, beträgt die Gesamtlänge 2431 bp. Bei acht von 50 getesteten Kolonien entsprach das Produkt dieser Länge (Abb. C.33; Klon 8, 14, 15, 18, 20, 27, 43, 48).

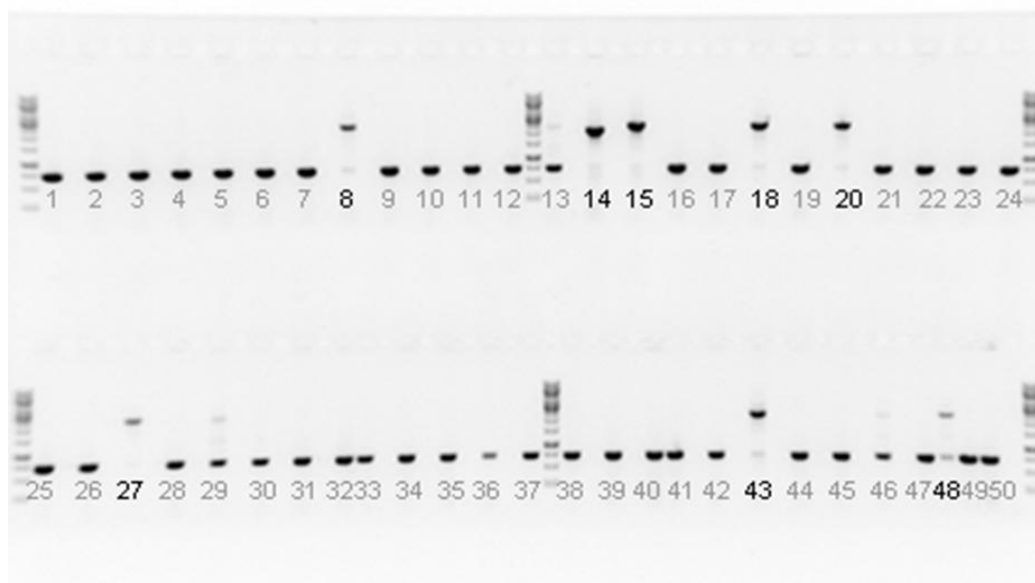


Abb. C.33 Screening nach Kolonien die Tn5 im Bereich um *trpC* hom eingebaut haben. Die Fragmente mit 729 bp Länge haben das Transposon an anderer Stelle integriert. Die deutlich längeren Fragmente 8, 14, 15, 18, 20, 27, 43 und 48 werden durch Sequenzierung genauer bestimmt.

Die Plasmide aus den acht Kolonien, deren PCR-Produkt dieser Länge entsprach, wurden isoliert und sequenziert. Es wurden hierfür die Primer T3 und T7, sowie Tet-1FP-1 und Tet-1RP-1 verwendet. T3 und T7 binden außerhalb von *trpC* hom im Plasmid, Tet-1FP-1 und Tet-1RP-1 binden an den Enden des Transposons (Abb. C.34).



Abb. C.34 Schematische Darstellung der Primerbindepositionen für die Sequenzierung der Insertionskassette.

Außer von Klon 14 konnten alle zusammengehörigen Sequenzdaten zu je einer Konsensussequenz vereinigt werden. Bei Klon 14 waren die Sequenzdaten zum Teil nicht auswertbar. Die erhaltenen Konsensussequenzen wurden auf eine möglichst zentrale Lage von Tn5 innerhalb der homologen Region untersucht. Eine schematische Übersicht der Anordnung der beiden Bereiche zueinander in den jeweiligen Plasmiden ist in Abb. C.35 wiedergegeben. Nach der Auswertung wurde für die weiteren Arbeiten Klon 43 (pSCA-*trpC*-Tn5) gewählt, da in diesem die Tetracyclinresistenz die homologe Region

trpC hom in annähernd gleich große Teile teilt (267 bp und 283 bp). Die genaue Sequenz des Inserts findet sich in G.3.

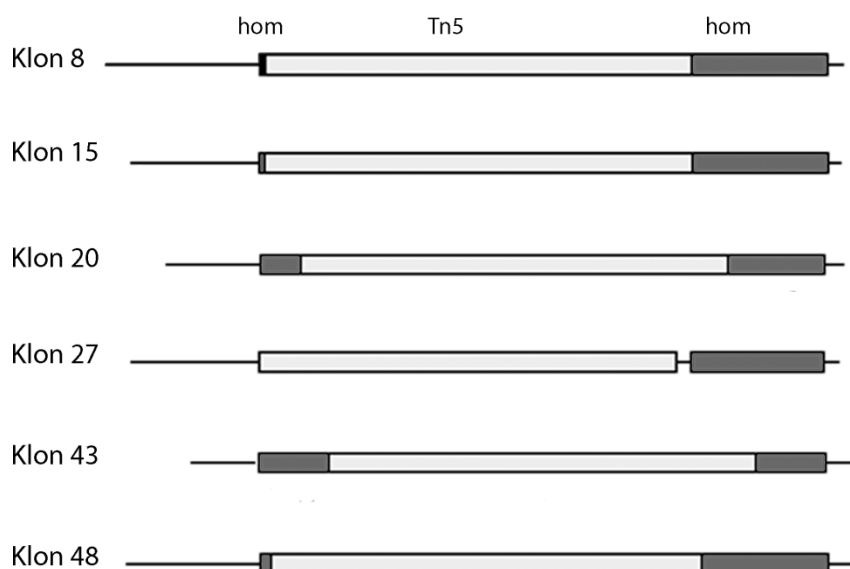


Abb. C.35 Schematische Darstellung der Anordnung von Tn5 (hell) und trpC hom (dunkel) zueinander in den jeweiligen Plasmiden der Klone.

C.5.5.3 Übertragung der Kassette in pGh9 und pEX18Ap

Damit war das Insert für die Übertragung in die Vektoren pGh9 und pEX18Ap vorbereitet. Dafür wurde es mit den Primern W56trpC XhoI-F und R amplifiziert. Diese Primer besitzen einen Überhang mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XhoI. Nach der Aufreinigung wurde das PCR-Produkt mit der Restriktionsendonuklease XhoI geschnitten (B.2.5.1), ebenso der Vektor pEX18Ap. pGh9 wurde mit Sall geschnitten. Die Enzyme XhoI und Sall sind Isocaudamere, d. h. sie haben unterschiedliche Erkennungssequenzen, erzeugen aber bei der Restriktion zueinander komplementäre Überhänge, weswegen sie miteinander ligiert werden können. Nach der Ligation der beiden geschnittenen Vektoren mit dem Insert, wurden die Konstrukte in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert und über die dadurch eingeführte Tetracyclinresistenz selektiert. Zusätzlich wurde die Länge des aufgenommenen Inserts mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft. Für die Klone mit pGh9 wurden die Primer W56trpC XhoI-F und R verwendet, für pEX18Ap die Primer M13 F und R. Um zusätzlich die Richtung der eingebauten Sequenz zu bestimmen wurden die nun erhaltenen Plasmide pGh9-trpC-Tn5 und pEX18Ap-trpC-Tn5 mit einer weiteren PCR getestet.

Diesmal wurden die Primer M13 F und W56trpC XhoI-F bzw. W56trpC XhoI-R eingesetzt (Abb. C.36). M13 bindet außerhalb des Inserts und kann nur mit einem der beiden Primer aus trpC hom ein Produkt bilden, wodurch die Richtung des Inserts bestimmt werden kann. Da sich nur mit dem Vorwärtsprimer ein Amplifikat bildete, war die Richtung des Inserts und damit die genaue Sequenz der neuen Plasmide bekannt.

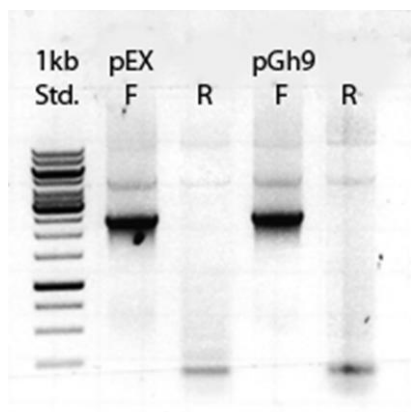


Abb. C.36 Bestimmung der Richtung des eingebauten Inserts mit Hilfe des Primers M13.

Spalte 2+3: pEX18Ap-trpC-Tn5; Spalte 4+5: pGh9-trpC-Tn5 jeweils in Kombination mit W56trpC XhoI-F oder W56trpC XhoI-R

Eine Übersicht über den Zusammenbau der Plasmide pGh9-trpC-Tn5 und pEX18Ap-trpC-Tn5 findet sich in Abb. C.37. Die Plasmide sind nun bereit für die Elektrottransformation in *L. casei* W56. Dort soll an den zu *trpC* homologen Bereichen der Plasmide eine Integration der Knock-Out-Kassette über eine zweistufige homologe Rekombination stattfinden (B.4).

C.5.6 Elektrottransformation der Plasmide pGh9-trpC-Tn5 und pEX18Ap-trpC-Tn5 in *L. casei* W56

Wie in B.4 bereits beschrieben, erfolgt die erste Selektion der transformierten *Lactobacillus*-Zellen über Antibiotikaresistenzen. Nach der Transformation von *L. casei* W56 mit pGh9-trpC-Tn5 konnten Erythromycinresistente *L. casei* W56 Kolonien auf Agarplatten angezogen werden, jedoch entwickelten diese keine Resistenz gegen Tetracyclin. Nach der Transformation von *L. casei* W56 mit pEX18Ap-trpC-Tn5, konnten weder Tetracyclin-, noch Ampicillinresistente Klone angezogen werden. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Klonierung hier nicht weiterverfolgt.

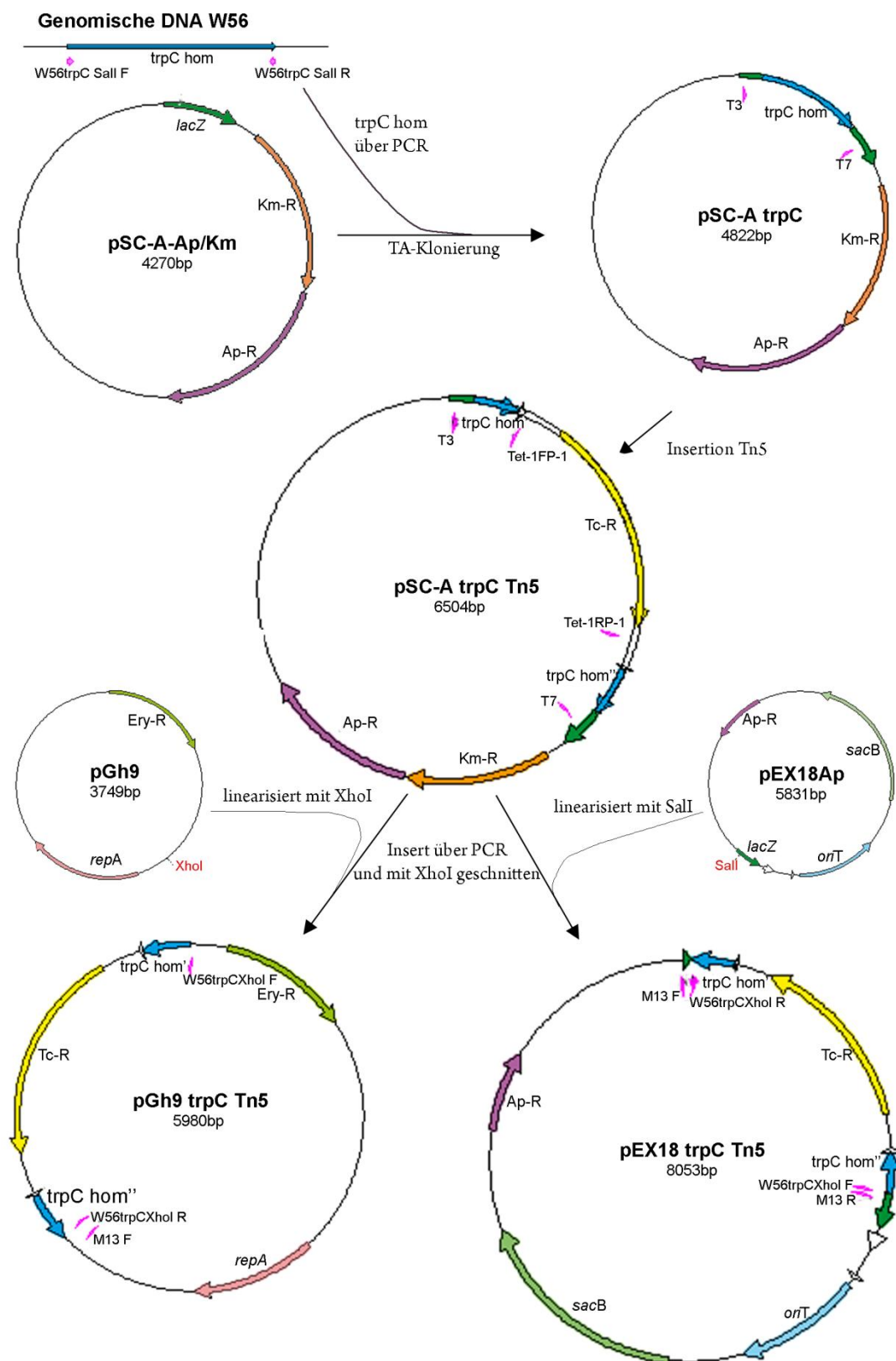


Abb. C.37 Übersicht Plasmidkonstruktion

D Diskussion

D.1 Die Aminosäure Tryptophan und D-Aminosäuren

Im Rahmen des Verbundprojekts „Immunologisch aktive niedrigmolekulare Substanzen probiotischer Bakterien“ wurde D-Tryptophan als immunologisch aktives Molekül identifiziert (C.2, G.1) und bildete den Hauptgegenstand in den weiteren Versuchen. Bei Tryptophan handelt es sich um eine aromatische α -Aminosäure, die, wie alle Aminosäuren, als L- und als D-Form vorkommen kann. Man spricht hier auch von Spiegelbildisomeren (Abb. D.1). Bei allen Lebewesen werden die Proteine fast ausschließlich aus L-Aminosäuren aufgebaut.

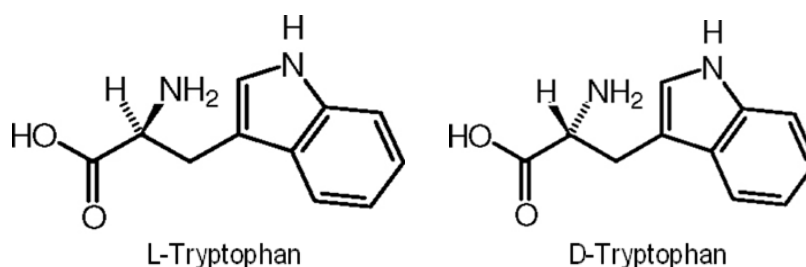


Abb. D.1 Tryptophan in der L- und D-Form

L-Tryptophan ist eine für den Menschen essentielle Aminosäure. Viele Bakterien hingegen können diese Aminosäure selbst synthetisieren. Die Synthese erfolgt ausgehend von Chorismat in sechs enzymatischen Reaktionen. Fünf der Gene für diese Enzyme sind bei Bakterien im *trp*-Operon (*trpABCFD*) angeordnet. Der Syntheseweg mit den zugehörigen Enzymen ist in der Übersicht Abb. D.2 dargestellt.

In der Medizin ist L-Tryptophan bisher vor allem als natürliches Antidepressivum und Beruhigungsmittel (Wyatt *et al.*, 1970) von Bedeutung. Dies ist auf seine Eigenschaft als Vorstufe des Neurotransmitters Serotonin zurückzuführen. Dadurch hat es auch Auswirkungen auf die Angstkonditionierung (Hindi Attar *et al.*, 2012). Auch der Abbau von L-Tryptophan ist auf Grund seiner Zwischenprodukte ins Interesse der Mediziner geraten. So haben Patienten mit rheumatischer Arthritis eine deutlich geringere Tryptophan-Konzentration im Blut, wohingegen die Menge an Kynurin, einem Abbauprodukt von Tryptophan, ansteigt (Opitz *et al.*, 2007). Einige Krebszellarten sind in der Lage das Enzym Tryptophan-2,3-dioxygenase (*tdo*) zu synthetisieren. Dieses Enzym katalysiert im L-Tryptophan-Abbau den ersten Schritt des Kynurin-Stoffwechselwegs. Durch die vermehrte Ausschüttung des Enzyms kommt es im menschlichen Körper zu einer erhöhten Toleranz gegenüber den Tumorzellen. Auf der Suche

nach einer geeigneten Krebsimmuntherapie wurde 1-Methyl-Tryptophan entdeckt, das in dendritischen Zellen als Inhibitor für Tryptophan-2,3-dioxygenase wirkt (Hou *et al.*, 2007). Während des Alterungsprozesses kommt es beim Menschen zu einer erhöhten Expression des Gens *tdo*, das mit der altersbedingten Anhäufung von fehlerhaft gefalteten oder giftigen Proteinen, wie zum Beispiel α -Synuclein, in Verbindung steht. Dieses Protein steht im Verdacht eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Parkinson zu spielen. Durch die vermehrte Expression von *tdo* kommt es zu einer Absenkung des L-Tryptophan-Spiegels. Durch Zugabe von L-Tryptophan kann den toxischen Effekten von α -Synuclein entgegengewirkt werden. Diese Erkenntnisse geben Hinweise auf mögliche Ansatzpunkte im Tryptophan-Biosyntheseweg zur Behandlung von altersbedingten Krankheiten (Goot *et al.*, 2012).

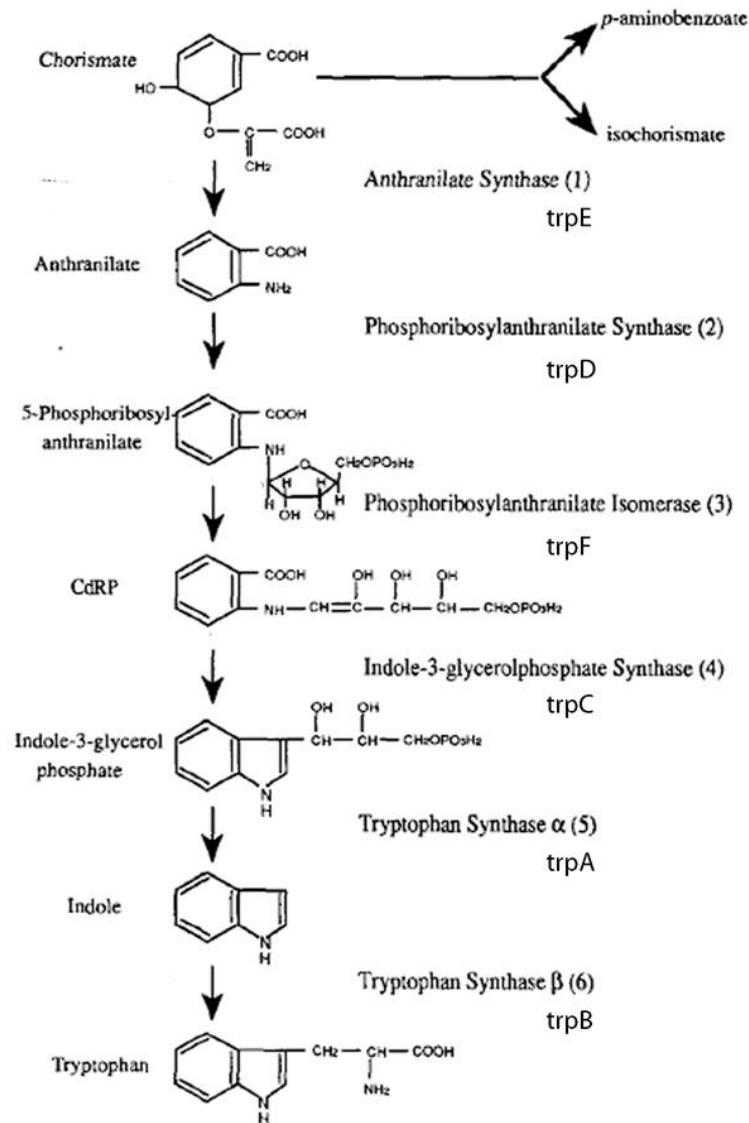


Abb. D.2 Biosyntheseweg von L-Tryptophan (Radwanski & Last, 1995)

D-Aminosäuren kommen in der Natur weitaus seltener vor als die L-Isomere. Gut erforscht ist ihre Beteiligung am Aufbau der Zellwand der *Bacteria*. Im Zellwandpolymer Peptidoglycan kommen D-Alanin und D-Glutamat vor. Bei Gram-positiven Bakterien macht der Peptidoglycananteil bis zu 90 % der gesamten Zellwand aus (Madigan & Martinko, 2006). Lam *et al.* (2009) konnten zeigen, dass *Vibrio cholerae* als Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen das Peptidoglycan mit anderen D-Aminosäuren moduliert. Außer den oben genannten D-Aminosäuren werden auch D-Methionin, D-Leucin, D-Phenylalanin und D-Tyrosin gebildet, sobald die Bakterien die stationäre Phase erreichen. Der Effekt, dass auch andere D-Aminosäuren in die Zellwand von Bakterien eingebaut werden können, wurde auch

beim Abbau von Biofilmen beobachtet. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass *Bacillus subtilis* eine Mischung aus D-Leucin, D-Methionin, D-Tyrosin und D-Tryptophan produziert und diese Aminosäuren anstelle des D-Alanins in die Zellwand eingebaut werden. Daraus resultiert eine Schwächung bzw. Hemmung der Biofilmbildung (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010). Ein möglicher biologischer Nutzen dieser Schwächung könnte sein, dass sich in älter werdenden Biofilmen Abfallprodukte anhäufen und Nährstoffe knapp werden, wodurch das Leben in einem Biofilm keinen Vorteil mehr für die Zellen bringt und dieser deswegen aufgelöst wird (Karatan & Watnick, 2009).

Es gibt Hinweise für weitere Bedeutungen der D-Aminosäuren als Botenstoffe. So können die meisten D-Aminosäuren, darunter auch D-Tryptophan, eine nicht durch Nährstoffmangel bedingte Sporulation in *Myxococcus xanthus* induzieren. Diese Art der Sporulation dient den Zellen vermutlich als Schutzmechanismus gegen Substanzen, die ihre Peptidoglykan-Struktur angreifen können (O'Connor & Zusman, 1997). Ein weiteres Beispiel ist die Regulation der Expression von *Escherichia coli* Virulenzgenen durch D-Serin im menschlichen Urin (Anfora *et al.*, 2007). D-Serin und D-Aspartat kommen auch in größeren Mengen im Gehirn von Nagetieren und Menschen vor (Hashimoto *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, dass D-Serin bei Mäusen von neuronalen Stammzellen synthetisiert wird und die neuronale Differenzierung unterstützt. Diese Erkenntnis könnte eine neue therapeutische Strategie für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen ermöglichen (Huang *et al.*, 2012). Diese Beispiele verdeutlichen die wichtige Rolle von D-Aminosäuren als Botenstoffe, sowohl bei Bakterien als auch beim Menschen. Die Verbindung beider Reiche ist auch einer der Kernaspekte des Verbundprojekts zu dem diese Arbeit gehört. Es konnte gezeigt werden, dass D-Tryptophan von einigen Bakterien produziert wird und eine immunmodulatorische Wirkung auf humane Zelllinien hat (Kepert *et al.*, eingereicht).

Im Gegensatz zu L-Tryptophan ist über Synthese und Bedeutung von D-Tryptophan in Bakterien wenig bekannt. Bisher gibt es kaum Erkenntnisse darüber, von welchen Faktoren die Fähigkeit der D-Tryptophan-Synthese abhängt und welche Bakterien dazu in der Lage sind. Diese Arbeit widmete sich daher der Untersuchung einiger Aspekte dieser Fragestellung der D-Tryptophan-Biosynthese.

D.2 Optimierung eines HPLC-basierten Testsystems für den quantitativen Nachweis von D-Tryptophan

Um die Produktion von D-Tryptophan in Bakterien untersuchen zu können wurde in dieser Arbeit ein quantitatives Analysesystem aufgebaut. Der Nachweis für D-Tryptophan basierte auf einer HPLC mit einem UV-Detektor. In herkömmlichen Nachweissystemen für D-Aminosäuren kommt häufig ein Derivatisierungsschritt zum Einsatz. In einer dieser Methoden wurde von Zhao & Liu (2001) für die Derivatisierung eine Fluoreszenz-Markierung mit Naphtalene-2,3-dialdehyd und zur chiralen Separierung Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin verwendet. Die Auftrennung erfolgte dann über micellare elektrokinetische Chromatographie. Diese Methode erreichte in humanen Urin-Proben eine Sensitivität von ca. 0,1 μ M. Auch die von unseren Kooperationspartnern verwendete Methode (G.1.2) beinhaltetete eine Derivatisierung (Brückner *et al.*, 1995). Hier wurden O-Phtaldialdehyde und N-Isobutyryl-L-Cysteine benutzt. Jedoch bereitete dieser Schritt in den dieser Arbeit vorangegangenen Experimenten immer wieder technische Schwierigkeiten, weswegen eine Methode ohne Derivatisierung entwickelt werden sollte.

Bereits 1961 wurde von Tashiro *et al.* eine radioaktive Markierung und Papierchromatographie für den Nachweis von D- und L-Tryptophan verwendet. Allerdings besteht bei Arbeiten mit radioaktiven Stoffen immer ein Sicherheitsrisiko, wohingegen die in dieser Arbeit verwendete Methode keinerlei zusätzliche Schutzmaßnahmen erfordert bzw. keine speziell lizenzierten Labore nötig sind.

Kotia *et al.* (2000) haben eine Methode entwickelt die Aptamere, verwendet, die an die stationäre Phase einer Kapillarelektrophorese gebunden sind. Bei den Aptameren handelt es sich um einzelsträngige Oligonucleotide, die mit einer hohen Affinität spezifisch an die Zielmoleküle binden. Der Nachteil dieser Methode gegenüber dem in dieser Arbeit verwendeten HPLC-System bestand jedoch darin, dass keine quantitativen Aussagen in der Unterscheidung der D- und L- Enantiomere getroffen werden konnten.

Eine dünnschicht-chromatographische Trennung an modifizierter Cellulose benötigt etwa eine Laufzeit von 15 h für eine vollständige Separierung von D- und L-Tryptophan. Durch die Verwendung von nicht-modifizierter Cellulose in der HPLC konnte die Laufzeit auf ca. 5 h verringert werden (Gübitz *et al.*, 1980). Das HPLC-System das in dieser Arbeit verwendet wurde, benötigt hingegen nur ca. 1 h.

Für die chirale Auftrennung über HPLC gibt es grundsätzlich vier verschiedenen Typen von Selektoren. Beim Brush- und beim Helix-Typ dienen derivatisierte Moleküle als chirale Selektoren. Beim Cavity-Typ werden funktionalisierte Cyclodextrine verwendet. Als letztes gibt

es noch die Möglichkeit des Liganden-Austauschs (Kim & Lee, 2000). Hierbei gehen die Aminosäuren einen dreifachen, gemischten Liganden Komplex mit einem Metal-Kation als Übergang zur stationären Phase ein (Davankov *et al.*, 1988). Dieses System bedarf im Gegensatz zu den anderen hier beschriebenen Trennverfahren keiner Vorbereitung der Proben durch Derivatisierung oder radioaktive Markierung.

Die Nachweisgrenze für Tryptophan unter Verwendung des ursprünglichen Protokolls, lag bei 1 µM in CDMI (C.3.1). Durch die Optimierung des eingesetzten Elutionsvolumens (C.3.2) werden anstatt der bisherigen 60-65 %, 97,5-98,5 % des eingesetzten Tryptophans aus der SPE zurückgewonnen. Weitere Optimierungen durch Einsatz eines höheren Probenvolumens in die SPE (C.3.3), sowie die Trocknung in der Vakuumzentrifuge sollten eine Erhöhung der Tryptophan-Konzentration nach folgender Berechnung ergeben:

$$\text{Konzentrierungsfaktor} = \frac{\text{Probenvolumen}}{\text{Endvolumen}}$$

Bei 20 ml eingesetztem Probenvolumen und einem Endvolumen von 300 µl nach der Trocknung erhält man einen theoretischen Konzentrierungsfaktor von 67. Wird ein Verlust von maximal 2,5 % durch die SPE mit eingerechnet und berücksichtigt, dass 100 µl durch die Filtrierung vor dem Trocknungsschritt in der Vakuumzentrifuge verloren werden, ergibt sich ein Faktor von 63. Der in dieser Arbeit experimentell ermittelte Wert liegt jedoch nur bei einer Konzentrierung um den Faktor 42. Eine der Ursachen für diese Differenz liegt an der Menge des eingesetzten Probenvolumens und der Säulensättigung. Unter C.3.3 wurde gezeigt, dass zwischen 15 und 20 ml eingesetztem Volumen, eine Sättigung der SPE-Säule eintritt. Danach wurde das Volumen auf 20 ml festgelegt, allerdings tritt die Sättigung schon früher ein. Nimmt man eine ideale Gerade an, so lässt sich eine Sättigung bei 17 ml berechnen. Wenn man dieses Volumen in die Berechnung des Konzentrationsfaktors einsetzt, ergibt sich daraus eine Konzentrierung um das 54-fache. Eine weitere Ursache liegt darin, dass durch die starke Konzentrierung auch das Hintergrund-Rauschen in den Chromatogrammen verstärkt wurde. Das Rauschen wurde durch die übrigen Bestandteile des Mediums verursacht, die ebenfalls aufkonzentriert werden. Durch diesen Effekt wurde die Sensitivität der Methode gemindert. Bei einer angenommen Konzentrierung um den Faktor 42, wie er in C.3.4 bestimmt wurde, sollte demnach die „neue“ Detektionsgrenze bei 24 nM Ausgangskonzentration liegen. In dieser Arbeit wurde in C.3.4 eine minimale Ausgangskonzentration von 25 nM experimentell ermittelt, was den theoretischen Wert bestätigt.

Die Ergebnisse von Kepert *et al.* (*eingereicht*) (G.1.3) zeigten, dass D-Tryptophan ab einer Konzentration von 10 nM in den durchgeführten Bioassays immunologisch aktiv war. Ab

100 nM wurde die volle Aktivität, wie sie auch in den kompletten Überständen und der 20 %-Methanol Fraktion gemessen wurde, festgestellt. Mit einer Detektionsgrenze von bis zu 25 nM sollte das hier optimierte Nachweissystem in der Lage sein, das in den Zellüberständen befindliche D-Tryptophan zu erfassen.

Allerdings stellte sich heraus, dass durch die Konzentrierung des im Medium enthaltenen L-Tryptophans ein schwacher D-Tryptophan-Peak überlagert wird und dieser damit nicht mehr messbar ist. Um 50 nM D-Tryptophan detektieren zu können, darf die Ausgangskonzentration an L-Tryptophan im Medium maximal 5 µM betragen. In den Proben in denen ursprünglich D-Tryptophan nachgewiesen wurde, betrug die Konzentration von L-Tryptophan jedoch 2,7 mM. Bei diesem sehr großen Überschuss an L-Tryptophan können nM-Konzentrationen von D-Tryptophan in den zellfreien Überständen mit dem HPLC-System nicht gemessen werden. Eine messbare D-Tryptophan-Synthese könnte in Reinkultur durchaus von einer mM-L-Tryptophan-Konzentration abhängig sein. *In vivo* könnten die Bedingungen anders sein, auf Grund des dort herrschenden Milieus und möglicher Interaktionen mit dem Wirt und anderen Mikroorganismen.

Die Ernte der Überstände wurde in der stationären Phase durchgeführt. In dieser Phase beenden die Zellen für gewöhnlich ihre Zellteilung und beginnen häufig ihren Stoffwechsel zu Gunsten der Produktion von sekundären Metaboliten zu ändern (Roszak & Colwell, 1987). Jedoch ist nicht bekannt, ob dies auch für D-Tryptophan zutrifft. Daher wäre es für die weitere Optimierung des Testsystems zunächst notwendig, die Phase der maximalen D-Tryptophan-Produktion zu ermitteln.

Ein weiterer Schritt könnte sein, die Menge an L-Tryptophan erst nach dem Wachstum der Bakterien im Medium zu reduzieren. Dazu könnte das Enzym Aspartat-Aminotransferase (AST) eingesetzt werden. Dieses Enzym kann neben L-Aspartat auch L-Tryptophan als Substrat verwerten (Mavrides & Orr, 1974). Dadurch würde die Menge an L-Tryptophan in den Proben verringert werden, die Menge an D-Tryptophan jedoch gleich bleiben. So könnte eine Überlagerung des D-Tryptophan-Peaks durch einen zu massiven L-Tryptophan-Peak vermieden werden, ohne dass die Wachstumsbedingungen für die Bakterien geändert werden müssen. Jedoch stand derzeit kein etablierter Enzym-Assay zur Verfügung.

D.3 Genomische Erkenntnisse zu *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102

D.3.1 Phylogenetische Einordnung

Eine phylogenetische Einordnung von Stämmen der „*L. casei*-Gruppe“ gestaltete sich schwierig, da noch immer darüber diskutiert wird, wie *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. paracasei* zu benennen sind und ob die bestehende phylogenetische Einteilung korrigiert werden muss. *L. casei* war zunächst auf Grund von phänotypischen Eigenschaften in fünf Untergruppen eingeteilt worden: *L. casei* subsp. *alactosus*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudoplatantum*, *L. casei* subsp. *rhamnosus*, and *L. casei* subsp. *tolerans* (Skerman *et al.*, 1980). Collins *et al.* (1989) führten nach DNS-Homologievergleichen eine neue Einteilung ein, die *L. casei* subsp. *rhamnosus* als eine eigene Art beschreibt: *L. rhamnosus*. *L. casei* subsp. *alactosus*, *L. casei* subsp. *pseudoplatantum*, *L. casei* subsp. *tolerans* und ein Großteil der *L. casei* subsp. *casei* wurden als *L. paracasei* zusammengefasst. Seither wurde immer wieder gefordert, einen anderen Typstamm für die Gruppe *L. casei* zu wählen und die Bezeichnung *L. paracasei* zurückzunehmen (Dellaglio *et al.*, 2002).

Schon mit diesem Hintergrund ist zu erkennen, dass eine phylogenetische Einteilung der drei Arten, *L. casei*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus*, durch Fermentationsprofile nicht eindeutig erreicht werden kann. Dennoch ist es möglich, diese Gruppe von anderen Lactobacillen abzugrenzen (Ward & Timmins, 1999). In dieser Arbeit erfolgte diese grobe Voreinteilung mit Hilfe der API50-Fermentationsprofile (C.4.1), mit denen die von der Firma Winclove erhaltenen Informationen bezüglich der Identität der Stämme bestätigt werden konnten. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass laut Hersteller-Angaben von 994 getesteten Stämmen, 6,99 % nicht identifiziert und 11,65 % falsch identifiziert wurden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine zusätzliche Überprüfung anhand der 16S-rDNS bei einigen Isolaten durchgeführt (C.4.1).

Obgleich diese Methode auf Grund der hohen Verwandtschaft zwischen den drei Arten nicht zu deren Unterscheidung herangezogen werden kann, zeigte sich doch jeweils die höchste Übereinstimmung zu Stämmen, die der von Winclove genannten Benennung entsprachen. Daher wurde die ursprünglich gegebene Einteilung beibehalten, obwohl für eine eindeutige Bestimmung eine DNS-DNS-Hybridisierung und eine Bestimmung weiterer physiologischer Merkmale nötig wären.

Einen weiteren Hinweis für die Identität von *L. casei* W56 lieferte die Suche der nächsten Verwandten die mit dem Annotations-Instrument „RAST“ durchgeführt wurde. Die Software

vergleicht Genome anhand eines Verzeichnisses, das komplett sequenzierte und akkurat annotierte Genome enthält. Als nächste Verwandte für *L. casei* W56 wurden hier *L. casei* ATCC 334 und *L. casei* BL23 angeführt; *L. casei* ATCC 334 wird in der Diskussion um die neue Einteilung der „casei“ Gruppe als neuer Typstamm vorgeschlagen (Dicks *et al.*, 1996).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine hohe Wahrscheinlichkeit für die richtige Einteilung der drei Stämme vorliegt, und verdeutlichen gleichzeitig deren enge Verwandtschaft. Diese ist für die ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführten Vergleiche auf DNS-Ebene von Bedeutung, da die Unterschiede in nah verwandten Genomen allgemein geringer sind als in Genomen weniger nah verwandter Bakterien.

D.3.2 Sequenzierung und Annotation der Lactobacillen-Genome

Für die Sequenzierung der beiden Genome von *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102 musste zwischen drei zur Verfügung stehenden Sequenzieretechniken gewählt werden: Dem 454-Pyrosequencing-System von Roche, dem HiSeq 2000 Sequenziersystem von Illumina und dem Ion Torrent von Life Technologies. Die Hauptunterschiede in den ausgegebenen Daten der drei Systeme liegen in der durchschnittlichen Leseweite und der Gesamtbasenanzahl. Zwar ist die Basenanzahl sowohl bei Illumina mit 200 Gbp als auch beim Ion Torrent mit ca. 1 Gbp pro Lauf deutlich höher, als bei der 454-Pyrosequenzierung mit 400 Mbp, dafür erreicht man mit letzterer eine durchschnittliche Leseweite von ca. 450 bp bis zu 700 bp gegenüber dem Illumina mit nur 100 bp bzw. 100+100 bp im „paired end“ Modus und dem Ion Torrent mit 200 bp.

Ein mittleres Lactobacillengenom hat in etwa eine Größe von 3 Mbp. Dies bedeutet, dass es bei einer erwarteten Basenanzahl von 100 Mbp aus einer Viertel-Platte der 454-Sequenzierung 33-fach abgedeckt wäre. Laut einer Studie von Lyons *et al.* (2011), in der Mutationen in *E. coli* untersucht wurden, ist eine ungefähr 30-fache Abdeckung optimal. Eine 20-fache Abdeckung wäre zu gering und bei über 50-facher Abdeckung werden keine Vorteile mehr aus der tieferen Sequenzierung gewonnen. Die kürzeren Leseweiten von HiSeq und Ion Torrent führen zu mehr Contigbrüchen und kürzeren Überlappungsbereichen. Dies erschwert die anschließende Kartierung der Genomdaten.

Aus diesen Gründen wurde der 454-Sequenzierung der Vorzug gegeben. Die tatsächliche mittlere Sequenzlänge nach der Sequenzierung in dieser Arbeit betrug für *L. casei* W56 348 bp und für *L. rhamnosus* W102 357 bp, die maximale Länge betrug 580 bp bzw. 731 bp. Die Gesamtbasenanzahl betrug für *L. casei* W56 111,5 Mbp. Dies entspricht in etwa einer

35-fachen Abdeckung des Genoms. Für *L. rhamnosus* W102 wurden 84 Mbp Gesamtbasenanzahl bestimmt, was einer 29-fachen Abdeckung gleichkommt. Dies entsprach weitgehend den erwarteten und für die weitere Annotation erforderlichen Werten.

Für das Genom von *L. casei* W56 wurden zwei unterschiedliche Annotationen durchgeführt. Zum einen die sehr schnelle Variante mit dem online verfügbaren Instrument „RAST“ und zum anderen die ausführliche Annotation des vollständigen Genoms durch unsere Kooperationspartner an der Universität Wien.

Die Annotation mit RAST ergab 3116 codierende Bereiche; damit war sie nah an dem Wert aus der detaillierten Annotation mit 3098 codierenden Sequenzen. Die nächsten Verwandten *L. casei* Stämme ATCC 334, BL23, BDII und besitzen 2926 bis 3139 codierende Sequenzen in ihrem Chromosom (Makarova *et al.*, 2006; Mazé *et al.*, 2010; Ai *et al.*, 2011). Damit wiesen beide Annotationsmodelle einen realistischen Wert auf. Aus den RAST-Ergebnissen konnten jedoch keine Informationen über die Anzahl der rRNA-Operons oder der tRNAs gezogen werden, weshalb hierfür die Ergebnisse der ausführlichen Annotation herangezogen werden mussten. Diese ergab mit fünf rRNA-Operons einen Wert, der auch in den Genomannotationen der anderen genannten *L. casei* Stämme angegeben wird. Außerdem konnten 60 Gene für tRNAs identifiziert werden. Dies deckt sich mit der Anzahl in *L. casei* BL23, während in den beiden anderen Stämmen je nur 59 Gene gefunden werden konnten (Makarova *et al.*, 2006; Mazé *et al.*, 2010). Abgesehen von BL23 tragen die hier verglichenen Stämme alle ein Plasmid. Dabei wurde festgestellt, dass das Plasmid aus *L. casei* W56 eine sehr hohe Ähnlichkeit mit pBDII aus *L. casei* BDII aufweist (Ai *et al.*, 2011). Einziger Unterschied ist ein 1038 bp langer Sequenzabschnitt, der hauptsächlich von einer Transposase abgedeckt wird.

Die hohen Übereinstimmungen in den publizierten Genomen mit den aus dieser Arbeit stammenden Ergebnissen für *L. casei* W56, lassen auf eine gute Qualität der Annotation schließen. Die Verwendung von RAST ist vor allem für einen schnellen Überblick geeignet, kann jedoch eine detaillierte Annotation nicht ersetzen.

D.3.3 Transposons in *L. casei* W56

Besondere Beachtung wurde bei der Annotation in dieser Arbeit den Transposons gewidmet. Transposons sind mobile, repetitive DNS-Sequenzen, die eine dynamische Komponente in Genomen darstellen (Quesneville *et al.*, 2005). Es ist notwendig, diese gesondert zu überprüfen, da sie beim Zuordnen von Contigs durch Übereinstimmungen mit dem Genom

eines nahe verwandten Organismus (mapping), wie es hier durchgeführt wurde, Probleme bereiten. Ursächlich hierfür sind zum einen die (unter Umständen mehrfachen) Wiederholungen der Sequenz innerhalb des Genoms, wobei diese nicht an denselben Stellen im Genom der beiden miteinander verglichenen Chromosomen liegen müssen. Zum anderen kann die Anzahl an flankierenden repetitiven Basen für jedes Transposon unterschiedlich sein. Der letzte der beiden Punkte fällt allerdings auf Grund der langen Sequenzabschnitte aus den 454-Sequenzierdaten nicht ins Gewicht, da mit wachsender Länge der sequenzierten Bereiche die Wahrscheinlichkeit wächst, dass eine solche repetitive Region mit einem einzigen zusammenhängenden Sequenzabschnitt komplett überspannt und somit sicher bestimmt werden kann. Position, Orientierung und Länge des Transposons wurden mit Hilfe von spezifischen Primern mittels PCR überprüft (C.4.6).

Makarova *et al.* (2006) haben in Genomanalysen von neun verschiedenen *Lactobacillen* festgestellt, dass jedes dieser Genome Transposons enthielt. Der Anteil am Gesamtgenom schwankt dabei von 0,2 % bei *L. gasseri* ATCC 33323 bis zu 5 % bei *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SKII. In *L. casei* W56 konnten fünf Transposons in ihrer Position und Richtung bestätigt werden, ihr Anteil am Gesamtchromosom beträgt 0,25 % und liegt damit im unteren Bereich der von Makarov gefundenen Werte.

D.3.4 Vergleich von Genen mit Relevanz für die Bakterien-Wirt-Interaktion probiotischer *Lactobacillen*

Außer dem Genomvergleich zwischen *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* W102 und *L. casei* W56 bezüglich der D-Tryptophanproduktion, wurden die Bakterien auch im Hinblick auf ihre grundsätzliche Eignung als Probiotika anhand ausgewählter Gene betrachtet. Hierbei wurden im Speziellen die genetischen Voraussetzungen zur Fähigkeit der Adhäsion an Mucosa-Oberflächen untersucht, denn gesundheitsfördernde Effekte könnten teilweise von dieser abhängig sein (von Ossowski *et al.* 2011). Darüber hinaus sind sie typisch für alle *Lactobacillen*, welche die intestinale Nische besiedeln (Kleerebezem *et al.* 2010). Für *L. rhamnosus* GG, der als bestuntersuchter und am häufigsten eingesetzter probiotischer Organismus gilt (Morita *et al.*, 2009), sind vor allem zwei Systeme beschrieben.

Eines sind die Pili-ähnlichen Oberflächenstrukturen, die wahrscheinlich Voraussetzung für die Langlebigkeit von *L. rhamnosus* GG im Darm sind. Hierfür verantwortlich sind zwei Cluster im Genom: *SpaCBA* und *spaFED*. *SpaFED* wurde auch schon in *L. rhamnosus* Lc705 gefunden, der sich jedoch nur deutlich kürzer im menschlichen Darm halten kann als *L. rhamnosus* GG. *SpaCBA* ist als artspezifische genetische Insel beschrieben. Außerdem ist bekannt, dass

spaC eine Schlüsselrolle für die Bindung zwischen der menschlichen Mucosa und *L. rhamnosus* GG spielt, wobei dem „von-Willebrand-Faktor“ (VWF) eine besondere Bedeutung zukommt (Kankainen et al. 2009). Die ursprüngliche Funktion des VWF im menschlichen Körper ist die Vermittlung sowohl bei der Anheftung als auch bei der Anlagerung der Thrombozyten. Er fungiert dabei als Bindeglied zwischen verletzter Stelle und Thrombozyten bzw. zwischen den Thrombozyten untereinander.

In *L. rhamnosus* W102 konnte eine 97 %ige Sequenzübereinstimmung für den Cluster *spaFED* identifiziert werden, der zweite Cluster konnte dagegen nicht gefunden werden. Bei *L. casei* W56 verhält es sich genau umgekehrt. Der Cluster *spaFED* hat keine homologen Bereiche in diesem Genom, aber *spaCBA* zeigt über 95 % Sequenzähnlichkeit zu drei Genen die ebenfalls als Cluster vorliegen. Die zu *spaC* ähnliche Sequenz enthält ebenfalls einen VWF. Außer den Pili-ähnlichen Oberflächenstrukturen besitzt *L. rhamnosus* GG auch ein Gen, das eine Homologie zu einem bekannten, für ein Mucosa spezifisches Adhesin (MBF - mucus binding factor) codierendes Gen aufweist (von Ossowski et al., 2011). Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Annotationen wurde zu diesem Gen in *L. rhamnosus* W102 eine 97 %ige Sequenzübereinstimmung gefunden. Auch in *L. casei* W56 konnte ein kurzes Stück (200bp) mit ähnlicher Sequenz gefunden werden. Dieses gehört zu einem Gen, das als „cell wall surface anchor family protein“ benannt wurde.

Außer der Fähigkeit zur Anheftung an die Mucosa sind zwei weitere Proteine bekannt, die von *L. rhamnosus* GG ausgeschieden werden und einen Nutzen für den Menschen bringen können. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, lösen diese Proteine anti-apoptotische und zellschützende Effekte bei Darmepithelzellen aus. Diese Proteine p40 und p75, die auch unter den Namen Msp2 und Msp1 bekannt sind, wurden bisher nur in *L. rhamnosus* und *L. casei* bzw. *paracasei* gefunden (Bäuerl et al., 2010; Kleerebezem et al., 2010). Für die aus *L. rhamnosus* GG bekannten Gene konnten in *L. rhamnosus* W102 mit einer Übereinstimmung von 99 % bzw. 98 % Homologe gefunden werden. Die Übereinstimmung zu Sequenzen aus *L. casei* W56 betrug zwar nur 80 %, jedoch sind diese Proteine auch aus *L. casei* BL23 bekannt (Mazé et al., 2010). Diese stimmen zu 100 % mit Sequenzen aus *L. casei* W56 überein.

Diese Ergebnisse verdeutlichen das grundsätzliche genetische probiotische Potential der beiden Stämme *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102. Für die Fähigkeit zur Anheftung an die Mucosa, die für das Überleben im menschlichen Darm eine Grundvoraussetzung zu sein scheint, sind die genetischen Strukturen vorhanden. Darüber hinaus scheint es, dass sowohl *L. casei* W56, als auch *L. rhamnosus* W102 die Proteine p40 und p75 produzieren können. Diesen kommt wachsende Bedeutung im Feld der probiotischen Forschung zu.

D.3.5 Vergleich möglicher am D-Tryptophan-Biosynthesewege beteiligter Gene

Zur Aufklärung des D-Tryptophan-Biosyntheseweges sollte eine gezielte Mutation der Tryptophan-Biosynthese in *L. casei* W56 durchgeführt werden. Vorab wurden die Sequenzdaten der D-Tryptophan positiven Stämme *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* GG mit der Sequenz des D-Tryptophan negativen Stammes *L. rhamnosus* W102 verglichen, um mögliche Zielgene, die an der Produktion von D-Tryptophan beteiligt sind, zu identifizieren.

D.3.5.1 Racemasen

Bei Racemasen handelt es sich um Enzyme, die die Fähigkeit haben, Inversionen in der Stereochemie zu katalysieren (Tanner & Kenyon, 1998). Dies trifft auch für die Umwandlung einer Aminosäure von der L- zur D-Form zu (Yoshimura & Esak, 2003). In *L. rhamnosus* GG sind bisher fünf Racemasen annotiert: die Aspartat Racemase *racD*, die Glutamat Racemase *murl*, die Alanine Racemase *alr* und zwei nicht weiter charakterisierte Racemasen *yhfX* und *menC* (Morita *et al.*, 2009). *Alr* und *murl* finden sich in allen Gram-positiven Bakterien (Walsh, 1989), da sie für den Aufbau der Interpeptidbrücken bei der Zellwandbildung nötig sind. Jedoch könnten sich diese Gene in der Spezifität ihrer aktiven Zentren unterscheiden. Aus *Pseudomonas putida* ist eine Racemase (*bar*) bekannt die, neben anderen, auch eine Spezifität für L-Tryptophan besitzt (Kino *et al.*, 2007). Anhand von Sequenzvergleichen und Modellierungen zwischen dieser Racemase und *alr* aus *L. rhamnosus* GG konnte eine große Ähnlichkeit in den aktiven Zentren der Proteine festgestellt werden. Jedoch wurde diese Ähnlichkeit auch bei *L. plantarum* WCFS1 festgestellt (persönliche Kommunikation mit Dr. Thorsten Schmidt und Veit Höhn). Es konnten jedoch weder eine immunologische Aktivität noch ein positiver D-Tryptophan-Nachweis des Überstands von *L. plantarum* WCFS1 gezeigt werden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass WCFS1 D-Tryptophan in geringsten Mengen produziert, die auf Grund der kleinen Konzentration weder detektiert werden kann noch eine Wirkung in den immunologischen Tests zeigt.

Die neu ermittelten Genomsequenzdaten von *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* W102 wurden auf das Vorhandensein von Genen mit hoher Ähnlichkeit zu den Racemasen aus *L. rhamnosus* GG hin überprüft. Es konnten *racD*, *murl* und *alr* gefunden werden, jedoch konnte keines dieser Gene ausschließlich in *L. casei* W56 detektiert werden. Wie schon für WCFS1 gilt jedoch auch hier, dass ein Vorhandensein einer Racemase in beiden Stämmen nicht deren Ausschluss als möglicherweise für die Umwandlung von L- in D-Tryptophan

verantwortliches Gen bedeutet. Auch bei *L. rhamnosus* W102 kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass D-Tryptophan in kleinen Mengen produziert wird. Des Weiteren gibt es in beiden Genomen noch uncharakterisierte Gene, die ebenfalls als mögliche Zielgene in Frage kommen.

D.3.5.2 Indol-3-Phosphat-Dehydrogenase (*trpC*)

Da der Vergleich der Genome weder einen Ausschluss noch einen sicheren Beleg für die Beteiligung von Racemasen brachte, könnte eine Knock-Out-Mutante zunächst klären, ob es sich bei der Produktion von D-Tryptophan um eine *de-novo*-Synthese oder eine Racemisierung von L-Tryptophan handelt. Eine Möglichkeit der *de-novo*-Synthese könnte über das Enzym Indol-3-Phosphat-Dehydrogenase (*trpC*) laufen (Yamamoto *et al.*, 1999). Das Gen *trpC* ist allerdings auch zur Synthese von L-Tryptophan nötig (Nichols, 1996) und daher in Bakterien unabhängig von ihrer Fähigkeit zur D-Tryptophan-Produktion vorhanden. Dennoch sollte nach dem Ausschalten dieses Gens eine Aussage über die D-Tryptophan-Produktion in dem mutierten Bakterium getroffen werden können. Die erste Frage ist dann, ob die Zellen ohne *trpC* lethal sind. Wäre dies der Fall so müsste das Medium mit aromatischen Aminosäuren versetzt werden, um damit den Verlust des Gens zu kompensieren. Es ist jedoch bekannt, dass *E. coli* *trpC* Knock-out-Mutanten ohne Zusätze im Medium wachsen konnten (Darimont *et al.*, 1998). Unabhängig davon, ob L-Tryptophan den *L. casei* W56 Mutanten zusätzlich gegeben wird, wäre es dann nötig, die Produktion von D-Tryptophan quantitativ zu prüfen. Dafür ist ein sensitives, quantitatives Testsystem für D-Tryptophan notwendig wie es in dieser Arbeit entwickelt wurde (C.3). Ist die D-Tryptophan-Synthese unabhängig von der Mutation in *trpC* ist von einem alternativen Syntheseweg auszugehen, der nicht im Zusammenhang mit der Synthese von L-Tryptophan steht. Gleiches gilt falls die Menge unabhängig von der Konzentration an zugegebenem L-Tryptophan ist.

D.4 Entwicklung eines Gen-Knock-Out-Mutagenesesystems in *L. casei* W56 mit dem Plasmid pGh9-*trpC*-Tn5

Um die Biosynthese von D-Tryptophan näher aufklären zu können waren eine Reihe von Entwicklungsarbeiten nötig. Diese dienten vorrangig der Etablierung eines geeigneten Mutagenesesystems.

D.4.1.1 Temperatursensitives Plasmid pGh9

Durch die Ausbildung einer Erythromycin-Resistenz und dem spezifischen Nachweis durch PCR wurde sichergestellt (C.5.3), dass das Plasmid pGh9 in *L. casei* W56 durch Elektrotransformation aufgenommen wurde. Die entscheidende Eigenschaft dieses Plasmids ist seine Temperatursensitivität, die in *Lactococcus* spp. bei erhöhter Wachstumstemperatur (35°C) zum Verlust des Plasmids führt. Dadurch kann eine geringe Transformationseffizienz, wie sie auch bei *Lactobacillus* spp. üblich ist, umgangen werden. Dies geschieht durch die Vermehrung der erhaltenen Klone nach der Elektrotransformation bei einer niedrigeren Temperatur. Erst im Anschluss erfolgt eine Selektion derjenigen Kolonien, die das Plasmid in ihr Genom integriert haben durch eine Erhöhung der Temperatur (Maguin *et al.*, 1992) (Abb. D.3).

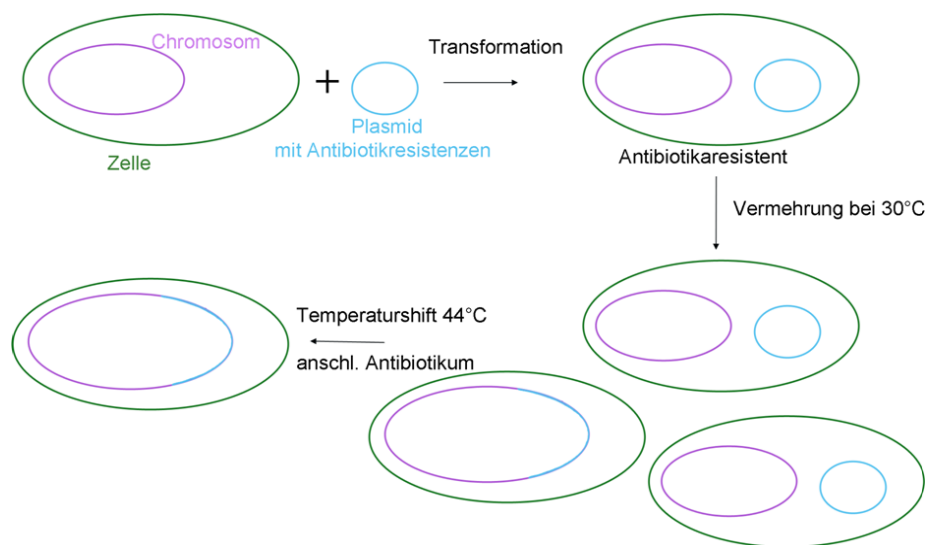


Abb. D.3 Schematische Darstellung der Selektion mit Hilfe eines temperatursensitiven Plasmids. Durch die Vermehrung der Zellen die das Plasmid vor dem zweiten Selektionsschritt aufgenommen haben, kann eine schlechte Transformationseffizienz ausgeglichen werden. Je mehr Zellen das Plasmid tragen, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der gewünschte homologe Teilbereich im Chromosom durch homologe Ereignisse ersetzt wird.

Diese Temperatursensitivität konnte auch in den meisten Lactobacillen zur Selektion von Mutanten genutzt werden; allerdings gibt es Ausnahmen wie *L. sakei*, bei dem pG⁺host-Derivate nicht temperatursensitiv waren (Gory *et al.*, 2001). Für *L. casei* ist bekannt, dass die pG⁺host-Derivate zwar temperatursensitiv sind, allerdings bei einer Temperatur, die nah an der für diese Bakterien maximalen Wachstumstemperatur liegt (Serror *et al.*, 2003). In Versuch C.5.2 wurde gezeigt, dass die maximale Wachstumstemperatur für *L. casei* W56 bei

44 °C liegt. Die standardmäßig verwendete Wachstumstemperatur für *Lactobacillus* spp. lag bei 37°C. Nach 20 h bei 44 °C waren noch 11 % resistent gegen Erythromycin, wohingegen 95% der Klone, die bei 37 °C inkubiert wurden, ihre Resistenz und damit das Plasmid behielten. Aus diesen Werten kann geschlossen werden, dass die Thermosensitivität zwar genutzt werden kann, jedoch nicht so stark ausgeprägt ist, wie in anderen Lactobacillen, bei denen durch die Temperaturerhöhung bis zu 99,99 % der Zellen das Plasmid verlieren (Mason *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse decken sich mit der oben beschriebenen Beobachtung, dass die Temperatursensitivität von pGh9 in *L. casei* bei einer Temperatur liegt, bei der das Wachstum von *L. casei* stark eingeschränkt ist.

Der zweite Selektionsschritt der Knock-Out-Mutagenese sollte über eine Tetracyclinresistenz erfolgen. Jedoch wurde keine Kolonie gefunden, die auf Nährböden mit Tetracyclin wuchs. Da jedoch die *E. coli*-Klone, in denen das Plasmid pGh9-trpC-Tn5 zuvor konstruiert wurde eine Tetracyclinresistenz entwickelten ist davon auszugehen, dass das für die Resistenz verantwortliche Gen nach wie vor intakt war. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass *L. casei* Nukleasen exprimiert, die das Resistenzgen nach Aufnahme in die Zellen zerstören oder es speziell in diesem Bakterium nicht exprimiert wird.

Doch auch ohne die Exprimierung einer Tetracyclin-Resistenz ist eine Selektion möglich, jedoch aufwendiger. Dabei sollten die Kolonien, die das Plasmid aufgenommen und in ihr Genom integriert haben, durch die Temperaturveränderung selektiert werden, was mittels PCR zu überprüfen ist. Anschließend werden diejenigen Kolonien daraus ausgewählt, die bei weiterem Wachstum bei maximaler Temperatur ihre Erythromycin-Resistenz wieder verlieren. Ob diese Zellen tatsächlich einen Knock-Out des gewünschten Gens enthalten, muss ebenfalls über PCR geprüft werden. Diese Selektionsmethode ist jedoch weitaus aufwendiger und weniger direkt, als die ursprünglich geplante. Für weitere Arbeiten sollte sie jedoch noch in Betracht gezogen werden.

Eine andere Möglichkeit den gewünschten Knock-Out zu erhalten wäre über zufällige Mutationen - etwa durch Transposonmutagenese, wie sie bei Licandro-Seraut *et al.* (2012) verwendet wurde, induziert durch Mikrowellenbestrahlung (Lin *et al.*, 2012) oder Ethylmethansulfonat (Breedveld *et al.*, 1998). Allerdings müssten diesen Methoden ausgedehnte Screening-Prozesse folgen, um entweder konkret eine *trpC*-Mutante zu finden oder Gene ausfindig zu machen, die an der Synthese von D-Tryptophan beteiligt sind.

D.4.1.2 Weitere Zielgene im Tryptophan-Biosyntheseweg

Ein weiterer Weg, um die Wahrscheinlichkeit eines Knock-Outs zu erhöhen, wäre ein längeres Gen als *trpC* als Ziel zu versuchen. Mit längeren homologen Regionen, steigt auch die Wahrscheinlichkeit an, dass ein zufälliges Rekombinationsereignis eintritt. Die homologen Regionen des konstruierten Plasmids pGh9-*trpC*-Tn5 haben eine Länge von 267 bp und 283 bp (C.5.5.2). Palumbo *et al.* (2004) dagegen verwenden für ihren Knock-Out der Alanin-Racemase homologe Teilbereiche mit einer Länge von 770 bp und 1100 bp. Dies deutet darauf hin, dass die Länge der gewählten *trpC*-Bereiche möglicherweise für eine effektive homologe Rekombination zu kurz war. Jedoch hat das Gen nur eine Gesamtlänge von 783 bp. Darüber hinaus konnten in der Arbeit von Muñoz-Provencio *et al.*, (2012) *Lactobacillus*-Mutanten mittels homologer Bereiche mit einer Länge von 352 bp generiert werden. Dies spricht dafür, dass die in dieser Arbeit verwendeten homologen Bereiche grundsätzlich eine ausreichende Länge aufwiesen. Dennoch könnte ein längeres Zielgen die Mutationshäufigkeit deutlich erhöhen. Hierfür in Frage kämen die Gene *trpB* und *trpF* die ebenfalls Bestandteil des an der Synthese von L-Tryptophan beteiligten *trp*-Operons sind und eine Länge von 1220 bp beziehungsweise 1026 bp haben.

D.5 Weiterführender Ausblick

Wie bereits in den jeweiligen Unterkapiteln der Diskussion dargestellt, können weitere Experimente zur Optimierung der bereits durchgeführten Versuche an diese Arbeit angeschlossen werden.

So sollten über das bereits vorhandene UPLC-System zunächst die optimalen Bedingungen für die D-Tryptophan-Produktion ermittelt werden, um dessen Konzentration in den Proben zu maximieren. Dies sollte die Detektion von D-Tryptophan mit der für größere Screeningversuche besser geeigneten HPLC-Methode verbessern. Des Weiteren könnte ein Transaminase-Assay entwickelt werden, um die hohe L-Tryptophan-Konzentration nach Wachstum der Bakterien selektiv zu reduzieren (D.2).

Zur Weiterführung der Knock-Out-Mutagenese kann der beschriebene alternative Selektionsweg ohne Tetracyclinresistenz verwendet werden, sowie eine Optimierung durch ein längeres Zielgen versucht werden. Darüber hinaus könnten auch zufällige Mutanten durch Transposon- oder induzierte Mutagenese erzeugt und auf ihre Fähigkeit zur D-Tryptophan-Produktion getestet werden (D.4).

Für das genauere Verständnis probiotischer Mechanismen sind noch viele andere Untersuchungen notwendig, die an diese Arbeit anknüpfen sollten. Einerseits steht die Analyse der aktiven Substanzen aus der 40%- und 50%-Methanol Fraktion von *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* GG aus der SPE noch aus. Andererseits sollte zum vertieften Verständnis der D-Tryptophan-Produktion aus mikrobiologischer Sicht untersucht werden, welche Parameter diese erhöhen können. Beispiele hierfür wären die Wachstumstemperatur, Wachstumsphase oder auch der pH-Wert. Schließlich sind auf der Seite des Wirtsorganismus (z.B. Maus) Versuche notwendig welche die gefundenen immunmodulatorischen Wirkungen von D-Tryptophan weiter *in vivo* vertiefen und beispielsweise nach einem Rezeptor für die D-Tryptophan-Wirkung suchen.

E Zusammenfassung

Das Interesse an probiotischen Bakterien und ihrem Nutzen für die menschliche Gesundheit steigt stetig. Allerdings ist wenig über die genauen Mechanismen, die hinter den beobachteten Effekten stehen, bekannt. Insbesondere gilt dies für die immunologische Wirkung niedermolekularer Substanzen auf das Immunsystem des Wirts.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von 49 Gram-positiven, größtenteils probiotischen Bakterien durchgeführt, um Medienzusammensetzung und Erntezeitpunkt zur Analyse niedermolekularer, immunologisch aktiver Moleküle zu optimieren. Aus den so erhaltenen Kulturüberständen konnten die Kooperationspartner vom Comprehensive Pneumology Center (immunologische Charakterisierung) und der Abteilung BioGeoChemie und Analytik (chemische Charakterisierung) des Helmholtz Zentrums München D-Tryptophan als immunologisch aktives Molekül identifizieren.

Um die Produktion von D-Tryptophan in breitangelegten Screeningversuchen von zellfreien Überständen nachzuweisen, wurde ein HPLC-basiertes Detektionssystem entwickelt. Die Trennung der Tryptophanisomere erfolgte hierbei mit Hilfe einer chiralen Säule. Die Optimierung von Probenaufreinigung und -konzentrierung mit Hilfe von Festphasen-Extraktion und Vakuumtrocknung ermöglichte eine Herabsetzung der Detektionsgrenze für D-Tryptophan auf 25 nM.

Die Genome von zwei ausgewählten Lactobacillen, die positiv bzw. negativ für die Produktion von D-Tryptophan getestet worden waren, wurden sequenziert. Für den D-Tryptophan-negativen Stamm *L. rhamnosus* W102 wurden 2977 Gene in den 94 „Large Contigs“ mit insgesamt 2,9 Mbp gefunden. Im Vergleich weist *L. rhamnosus* GG 2834 Gene bei einer Genomgröße von 3,0 Mbp auf. Für den D-Tryptophan-produzierenden Stamm *L. casei* W56 konnte das Genom nach 454-Pyrosequenzierung und durch Sangersequenzierung von Teilsequenzen geschlossen werden. Das Genom von *L. casei* W56 besteht demnach aus 3,1 Mbp, die sich in die chromosomale DNS und ein Plasmid aufteilen und 3098 Gene beinhalten. 60 davon codieren für tRNS und es liegen fünf rRNS-Operone vor. Die nächsten verwandten *L. casei* Stämme besitzen 2858 bis 3139 codierende Sequenzen in ihrem Chromosom.

Ein Sequenzvergleich mit dem gutuntersuchten probiotischen Stamm *L. rhamnosus* GG, der ebenfalls D-Tryptophan produziert, ergab, dass die genetischen Strukturen für die Fähigkeit zur Anheftung an die Mucosa vorhanden sind, was für das Überleben im menschlichen Darm eine Grundvoraussetzung zu sein scheint. Dies gilt vor allem für den in *L. casei* W56 gefundenen Gencluster *spaCBA*, der ebenso in *L. rhamnosus* GG identifiziert und als Ursache

für dessen außergewöhnliche Langlebigkeit im Darm beschrieben wurde. Darüber hinaus besitzen sowohl *L. casei* W56 als auch *L. rhamnosus* W102 die Gene zur Expression der Proteine p40 und p75. Von diesen ist bekannt, dass sie von *L. rhamnosus* GG sezerniert werden und anti-apoptotische und zell-schützende Effekte bei Darmepithelzellen auslösen.

Bei der Untersuchung der erzeugten Genomsequenzen auf potentielle Gene des D-Tryptophan-Biosynthesewegs standen besonders Racemasen im Vordergrund, die eine Isomerisierung von L- zu D-Tryptophan katalysieren könnten. In *L. rhamnosus* GG sind fünf Racemasen bekannt, wobei drei davon ebenfalls in den beiden in dieser Arbeit sequenzierten Lactobacillen gefunden wurden, jedoch keine ausschließlich in den D-Tryptophan-positiven Stämmen *L. rhamnosus* GG und *L. casei* W56. Trotz ihrer Sequenzähnlichkeit könnten sich diese Racemasen jedoch in ihren aktiven Zentren unterscheiden und diese dadurch für die unterschiedliche Befähigung zur D-Tryptophan-Produktion verantwortlich sein. Eine Synthese von D-Tryptophan wäre jedoch auch ohne die Beteiligung einer Racemase über einen alternativen Syntheseweg denkbar oder über die Racemisierung eines Intermediats im Biosyntheseweg, wie beispielsweise Alanin.

Für die Aufklärung des D-Tryptophan-Biosynthesewegs sollten mit Hilfe von gezielten Knock-Out-Mutanten daran beteiligte Gene identifiziert werden. Hierfür wurden zwei Vektoren, pGh9-trpC-Tn5 und pEX18Ap-trpC-Tn5, konstruiert die als erstes Zielgen *trpC*, ein aus dem L-Tryptophan-Biosyntheseweg bekanntes Gen, als Zielsequenz für die homologe Rekombination beinhalteten. Eines der beiden Plasmide war *pGhost9*, das häufig als Vektor für Lactobacillen eingesetzt wird, da es einen temperatursensitiven Replikationsursprung besitzt. Dieses konnte über Elektrottransformation in die Zellen überführt und ebenso die Selektion bei erhöhter, für *L. casei* W56 optimierter, Wachstumstemperatur gezeigt werden. Damit steht nun ein Knock-Out-System für die Erzeugung von Mutanten zur weiteren detaillierten Analyse der Biosynthese von D-Tryptophan und potentiell probiotisch relevanter Gene zur Verfügung.

F Literaturverzeichnis

Ai L, Chen C, Zhou F, Wang L, Zhang H, Chen W, Guo B. 2011. Complete genome sequence of the probiotic strain *Lactobacillus casei* BD-II. *Journal of Bacteriology* **193**: 3160–3161.

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403–410.

Anfora AT, Haugen BJ, Roesch P, Redford P, Welch R. 2007. Roles of serine accumulation and catabolism in the colonization of the murine urinary tract by *Escherichia coli* CFT073. *Infection and Immunity* **75**: 5298–5304.

Aron-Wisnewsky J, Doré J, Clement K. 2012. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology* **9**: 590–598.

Asahara T, Shimizu K. 2004. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. *Infection and Immunity* **72**: 2240–2247.

Aukrust T, Blom H. 1992. Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Research International* **25**: 253–261.

Aziz RK, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards R, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, et al. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**: 75.

Baarden P van, Troost F, Meer C van der, Hooiveld G, Boekschoten M, Brummer RJM, Kleerebezem M. 2011. Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 4562–4569.

Badger JH, Olsen GJ. 1999. CRITICA: coding region identification tool invoking comparative analysis. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 512–524.

Bäuerl C, Pérez-Martínez G, Yan F, Polk DB, Monedero V. 2010. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **19**: 231–241.

Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* **17**: 478–486.

Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter M-C, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, et al. 2003. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Research* **31**: 365–370.

Boyle RJ, Tang MLK. 2006. The role of probiotics in the management of allergic disease clinical and experimental allergy. *Clinical and Experimental Allergy* **36**: 568–576.

Braat H, Van den Brande J, Van Tol E, Hommes D, Peppelenbosch M, Van Deventer S. 2004. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80**: 1618–1625.

- Breedveld M, Bonting K, Dijkhuizen L. 1998.** Mutational analysis of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1. *FEMS microbiology letters* **169**: 241–249.
- Brückner H, Westhauser T, Godel H. 1995.** Liquid chromatographic determination of D- and L-amino acids by derivatization with o-phthaldialdehyde and N-isobutyryl-L-cysteine. Applications with reference to the analysis of peptidic antibiotics, toxins, drugs and pharmaceutically used amino acids. *Journal of Chromatography. A* **711**: 201–215.
- Bruzzese E, Raia V, Spagnuolo MMI, Volpicelli M, De Marco G, Maiuri L, Guarino A. 2007.** Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: A pilot study. *Clinical Nutrition* **26**: 322–328.
- Cash HL, Whitham C V, Behrendt CL, Hooper L V. 2006.** Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science (New York, N. Y.)* **313**: 1126–1130.
- Chen YSY-S, Jan RLR-L, Lin YLY-L, Chen H-HH, Wang J. J-Y. 2010.** Randomized placebo-controlled trial of *Lactobacillus* on asthmatic children with allergic rhinitis. *Pediatric Pulmonology* **45**: 1111–1120.
- Clark D, Pazdernik N. 2009.** *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*.
- Collins MD. 1989.** Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**: 105–108.
- Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. 2009.** Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* **326**: 1694–1697.
- Darimont B, Stehlin C, Szadkowski H, Kirschner K. 1998.** Mutational analysis of the active site of indoleglycerol phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Protein Science* **7**: 1221–1232.
- Davankov V, Kurganov A., Ponomereva T. 1988.** Enantioselectivity of complex formation in ligand-exchange chromatographic systems with chiral stationary and/or chiral mobile phases. *Journal of Chromatography* **452**: 309–316.
- Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. 2007.** Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* **23**: 673–679.
- Dellaglio F, Felis GE, Torriani S. 2002.** The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 285–287.
- Derrien M, Van Passel MW, Van de Bovenkamp JH, Schipper RG, De Vos WM, Dekker J. 2010.** Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut microbes* **1**: 254–268.

Dicks LMT, Plessis EM Du, Dellaglio F, Lauer E. 1996. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* norn. rev., Designation of ATCC 334 as the Neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 337–340.

Dobell C. 1920. Discovery of the intestinal protozoa of man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **13**: 1–15.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 11971–11975.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman D a. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)* **308**: 1635–1638.

Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit. 2010. *EFSA delivers advice on further 808 health claims.*

Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk J, Druart C, Bindels L, Guiot Y, Derrien M, Muccioli G, Delzenne N, et al. 2013. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 9066–9071.

FAO/WHO. 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutrition* **85**.

Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 17994–17999.

Fontaine MMC, Lee JJJ, Kehoe MAM. 2003. Combined Contributions of Streptolysin O and Streptolysin S to Virulence of Serotype M5 *Streptococcus pyogenes* Strain Manfredo. *Infection and Immunity* **71**: 3857–3865.

Fooks LJ, Gibson GR. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *The British Journal of Nutrition* **88**: 39–49.

Fritsche W. 1999. *Mikrobiologie*. Heidelberg Berlin: Spektrum akademischer Verlag.

Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. 2001. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *Journal of Clinical Immunology* **21**: 264–271.

Goot A van der, Zhu W, Vazquez-Manrique RP, Seinstra RI, Dettmwe K, Michels H, Farina F, Krijnen J, Melki R, Buijsmann RC, et al. 2012. Delaying aging and the aging-associated decline in protein homeostasis by inhibition of tryptophan degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 14912–14917.

Gorbach SL, Goldin BR. 1989. US4839281 (A) - *Lactobacillus* strains and methods of selection.

- Gordon S. 2008.** Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European Journal of Immunology* **38**: 3257–3264.
- Gory L, Montel MC, Zagorec M. 2001.** Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. *FEMS microbiology letters* **194**: 127–33.
- Griffiths-Jones S, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Eddy SR, Bateman A. 2005.** Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. *Nucleic Acids Research* **33**: 121–124.
- Grütz G. 2005.** New insights into the molecular mechanism of interleukin-10- mediated immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology* **77**: 3–15.
- Gübitz G, Jellenz W, Schönleber D. 1980.** High Performance Liquid Chromatographic resolution of the optical isomers of D, L-Tryptophane , D, L-5-Hydroxytryptophan and D, L-Dopa on cellulose columns. *Journal of High Resolutuion Chromatography* **3**: 31–32.
- Hapfelmeier S, Lawson M a E, Slack E, Kirundi JK, Stoel M, Heikenwalder M, Cahenzli J, Velykoredko Y, Balmer ML, Endt K, et al. 2010.** Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science (New York, N.Y.)* **328**: 1705–1709.
- Harris K, Kassis A, Major G, Chou CJ. 2012.** Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *Journal of Obesity* **2012**: Article ID 879151, 14 pages.
- Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T. 1995.** Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *The European Journal of Neuroscience* **7**: 1657–1663.
- Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. 2005.** Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of medical microbiology* **54**: 1093–1101.
- Hijnen D, De Bruin-Weller M, Oosting B, Lebre C, De Jong E, Bruijnzeel-Koomen C, Knol E. 2004.** Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* **113**: 334–340.
- Hindi Attar C, Finckh B, Büchel C. 2012.** The influence of serotonin on fear learning. *PloS one* **7**: e42397.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma a J, Schweizer HP. 1998.** A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77–86.
- Hooper L V. 2001.** Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**: 1115–1118.
- Hooper L V, Macpherson AJ. 2010.** Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews. Immunology* **10**: 159–169.

Hou D-Y, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC, Munn DH. 2007. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Research* **67**: 792–801.

<http://grf.lshtm.ac.uk/sequencing.htm>.

Huang X, Kong H, Tang M, Lu M, Ding J-H, Hu G. 2012. D-Serine regulates proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from postnatal mouse forebrain. *CNS neuroscience & therapeutics* **18**: 4–13.

Hug T. 2009. Herstellung und Charakterisierung einer rekombinanten, sequenzspezifischen Protease zur Generierung bioaktiver Peptide. : Dissertation.

Hummel S, Veltman K, Cichon C, Sonnenborn U, Schmidt MA. 2012. Differential targeting of the E-Cadherin/ β -Catenin complex by gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 1140–1147.

Hunter S, Jones P, Mitchell A, Apweiler R, Attwood TK, Bateman A, Bernard T, Binns D, Bork P, Burge S, et al. 2012. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Research* **40**: 306–312.

Hyatt D, Chen G-L, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**: 119–130.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**: 931–945.

Kaburagi T, Yamano T, Fukushima Y, Yoshino H, Mito N, Sato K. 2007. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 on immune function and serum albumin in aged and malnourished aged mice. *Nutrition* **23**: 342–350.

Kalliomäki M, Salminen S, Poussa TT, Arvilommi H, Isolauri E. 2003. Probiotics and prevention of atopic disease : 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial For personal use . Only reproduce with permission from The Lancet Publishing Group . *Lancet* **361**: 1869–1871.

Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, Von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P, Satokari R, Vesterlund S, Hendrickx AP, Lebeer S, et al. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 17193–17198.

Kanno T, Matsuki T, Oka M, Utsunomiya H, Inada K, Magari H, Inoue I, Maekita T, Ueda K, Enomoto S, et al. 2009. Gastric acid reduction leads to an alteration in lower intestinal microflora. *Biochemical and biophysical research communications* **381**: 666–670.

Karatan E, Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **73**: 310–347.

Kepert I, Fonseca J, Müller C, Hochwind K, Dehmel S, Nathan P, Milger K, Eickelberg O, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P, et al. Screening supernatants of probiotic bacterial supernatants reveals D-Tryptophan as soluble compound with immune modulatory activity. *eingereicht*.

Kim K, Lee K. 2000. Chiral Separation of Tryptophan Enantiomers by Liquid Chromatography with BSA-Silica Stationary Phase. *Biotechnology and Bioprocess engineering* **5**: 17–22.

Kino K, Sato M, Yoneyama M, Kirimura K. 2007. Synthesis of DL-tryptophan by modified broad specificity amino acid racemase from *Pseudomonas putida* IFO 12996. *Applied microbiology and biotechnology* **73**: 1299–1305.

Klaenhammer TR, Kleerebezem M, Kopp MV, Rescigno M. 2012. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nature reviews. Immunology* **12**: 728–734.

Kleerebezem M, Hols P, Bernard E, Rolain T, Zhou M, Siezen RJ, Bron P. 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews* **34**: 199–230.

Knap I, Kehlet B, Bennedsen M, Mathis GF, Hofacre CL, Lumpkins BS, Jensen MM, Raun M, Lay A. 2011. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poultry Science* **90**: 1690–1694.

Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 4578–4585.

Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R. 2010. D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science* **328**: 627–629.

Kotia RBR, Li L, McGown LLB. 2000. Separation of nontarget compounds by DNA aptamers. *Analytical Chemistry* **72**: 827–831.

Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Staerfeldt H-H, Rognes T, Ussery DW. 2007. RNAMmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic acids research* **35**: 3100–3108.

Lam H, Oh D-C, Cava F, Takacs CN, Clardy J, De Pedro M a, Waldor MK. 2009. D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science (New York, N. Y.)* **325**: 1552–1555.

Lane DJ. 1991. 16S and 23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (E Stackebrandt and M Goodfellow, Eds.). New York.

Leewenhoeck A. 1684. An abstract of a letter from Mr. Anthony Leewenhoeck at Delft, Dated Sep. 17. 1683. Containing some microscopical observations, about animals in the scurf of the teeth, the substance call'd Worms in the nose, the cuticula consisting of scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **14**: 568–574.

Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Jeffrey I. 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews. Microbiology* **6**: 776–788.

Licandro-Seraut H, Brinster S, Van de Guchte M, Scornec H, Maguin E, Sansonetti P, Cavin J-F, Serror P. 2012. Development of an efficient in vivo system (Pjunc-TpaseI S1223) for random transposon mutagenesis of *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 5417–5423.

Licciardi PV, Tang ML. 2011. Vaccine adjuvant properties of probiotic bacteria. *Discovery Medicine* **12**: 525–533.

Lin H, Chen X, Yu L, Xu W, Wang P, Zhang X, Li W, Li C, Ren N. 2012. Screening of *Lactobacillus rhamnosus* strains mutated by microwave irradiation for increased lactic acid production. *African Journal of Microbiology Research* **6**: 6055–6065.

Lomax AR, Calder PC. 2009. Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. *Current Pharmaceutical Design* **15**: 1428–1518.

Lowe TM, Eddy SR. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* **25**: 955–964.

Lozupone C a, Knight R. 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 11436–40.

Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, et al. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**: 1363–1371.

Lukashin a V, Borodovsky M. 1998. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic acids research* **26**: 1107–1115.

Luoto R, Kalliomäki M, Laitinen K, Isolauri E. 2010. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. *International journal of obesity (2005)* **34**: 1531–1537.

Lutgendorff F, Nijmeijer RM, Sandström P a, Trulsson LM, Magnusson K-E, Timmerman HM, Van Minnen LP, Rijkers GT, Gooszen HG, Akkermans LM a, et al. 2009. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis. *PloS one* **4**: e4512.

Lyons E, Freeling M, Kustu S, Inwood W. 2011. Using genomic sequencing for classical genetics in *E. coli* K12. *PloS one* **6**: e16717.

Madigan MTM, Martinko JJM. 2006. *Brock Mikrobiologie*. München: Pearson Studium.

Maguin E, Duwat P, Hege T, Ehrlich D, Gruss A. 1992. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* **174**: 5633–5638.

Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, et al. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 15611–15616.

- Malago JJ, Tooten PCJ, Koninkx JFJG. 2010.** Anti-inflammatory properties of probiotic bacteria on Salmonella-induced IL-8 synthesis in enterocyte-like Caco-2 cells. *Beneficial Microbes* **1**: 121–130.
- Mason CK, Collins M a, Thompson K. 2005.** Modified electroporation protocol for Lactobacilli isolated from the chicken crop facilitates transformation and the use of a genetic tool. *Journal of Microbiological Methods* **60**: 353–363.
- Mavrides C, Orr W. 1974.** Multispecific aspartate and aromatic amino acid aminotransferases in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **250**: 4128–4133.
- Mazé A, Boël G, Zúñiga M, Bourand A, Loux V, Yebra MJ, Monedero V, Correia K, Jacques N, Beauvils S, et al. 2010.** Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *Journal of Bacteriology* **192**: 2647–2648.
- Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Mueller M, Radke M, Blaut M. 2008.** Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatric Research* **64**: 418–422.
- Mørseth T, Hagen B, Axelsson L. 1998.** A new, completely defined medium for meat lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* **85**: 715–722.
- Morita H, Toh H, Oshima K, Murakami M, Taylor TD, Igimi S, Hattori M. 2009.** Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Journal of Bacteriology* **191**: 7630–7631.
- Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. 2002.** Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **32**: 105–110.
- Muñoz-Provencio D, Rodríguez-Díaz J, Collado MC, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, Monedero V. 2012.** Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 8684–8693.
- Nichols BP. 1996.** Evolution of genes and enzymes of tryptophan biosynthesis. Neidhardt FC. ed. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. 2638–2648.
- Niers LEM, Timmerman HM, Rijkers GT, Van Bleek GM, Van Uden NOP, Knol EF, Kapsenberg ML, Kimpfen JLL, Hoekstra MO. 2005.** Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clinical and Experimental Allergy* **35**: 1481–1489.
- O'Connor K a, Zusman DR. 1997.** Starvation-independent sporulation in *Myxococcus xanthus* involves the pathway for beta-lactamase induction and provides a mechanism for competitive cell survival. *Molecular Microbiology* **24**: 839–850.
- O'Hara AM, Shanahan F. 2006.** The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports* **7**: 688–693.
- Ölschläger TA. 2010.** Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology* **300**: 57–62.

- Opitz C a, Wick W, Steinman L, Platten M. 2007.** Tryptophan degradation in autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**: 2542–2563.
- Von Ossowski I, Satokari R, Reunanen J, Lebeer S, De Keersmaecker SCJ, Vanderleyden J, De Vos WM, Palva A. 2011.** Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 4465–4472.
- Palumbo E, Favier CF, Deghorain M, Cocconcelli PS, Grangette C, Mercenier A, Vaughan EE, Hols P. 2004.** Knockout of the alanine racemase gene in *Lactobacillus plantarum* results in septation defects and cell wall perforation. *FEMS Microbiology Letters* **233**: 131–138.
- Plassmann D, Schulte-Witte H. 2007.** Treatment of irritable bowel syndrome with *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN): a retrospective survey. *Medizinische Klinik* **102**: 888–892.
- Pop M, Phillippy A, Delcher AL, Salzberg SL. 2004.** Comparative genome assembly. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 237–248.
- Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO. 2012.** SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**: 1823–1829.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, et al. 2010.** A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59–65.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glockner FO, Glöckner FO. 2012.** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**: 590–596.
- Quesneville H, Bergman CM, Andrieu O, Autard D, Nouaud D, Ashburner M, Anxolabehere D. 2005.** Combined evidence annotation of transposable elements in genome sequences. *PLoS Computational Biology* **1**: 166–175.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. 1996.** Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* **242**: 84–89.
- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen F, Jeppesen DL, Valerius H, Paerregaard A, Copenhagen D. 2003.** Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *Journal of Clinical Immunology* **111**: 389–395.
- Roszak DB, Colwell RR. 1987.** Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* **51**: 365–379.
- Sambrook J, Russell DW, Russel D. 2001.** *Molecular Cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dos Santos VM, Müller M, De Vos WM. 2010.** Systems biology of the gut: the interplay of food, microbiota and host at the mucosal interface. *Current opinion in Biotechnology* **21**: 539–550.

- Savijoki K, Suokko A, Palva A, Varmanen P. 2006.** New convenient defined media for [(35)S]methionine labelling and proteomic analyses of probiotic lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology* **42**: 202–209.
- Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, et al. 2009.** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research* **37**: 5–15.
- Schiffrin E, Brassart D, Servin A, Rochat F, Donnet-Hughes A. 1997.** Immune modulation lactic acid bacteria : of blood leukocytes in humans criteria for strain selection13 by. *The American Journal of Clinical Nutrition* **66**: 515–520.
- Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. 1995.** Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **78**: 491–497.
- Schlegel HHG, Zabarosch C, Zaborosch C. 1992.** *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Thieme.
- Serror P, Ilami G, Chouayekh H, Ehrlich SD, Maguin E. 2003.** Transposition in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: identification of two thermosensitive replicons and two functional insertion sequences. *Microbiology* **149**: 1503–1511.
- Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, Eriotou E, Michopoulos S, Tsakalidou E, Mentis A. 2004.** In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 518–526.
- Skerman VBD, McGowan 'VICKI, Sneath P. 1980.** Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**: 225–420.
- Stecher B, Maier L, Hardt W-D. 2013.** “Blooming” in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature reviews. Microbiology* **11**: 277–284.
- Steinbüchel A, Arenskötter M, Wältermann M, Voß I. 2005.** Übungen zum Modul „Molekularbiologische Charakterisierung bakterieller Gene“. *Westfälische Wilhelms-Universität Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie*.
- Stoffels M. 1998.** Identifizierung und Anreicherung von Bakterien durch verschiedene molekulare in situ und in vitro Hybridisierungstechniken. *Dissertation*.
- Szachta P, Ignyś I, Cichy W. 2011.** An evaluation of the ability of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG to eliminate the gastrointestinal carrier state of vancomycin-resistant enterococci in colonized children. *Journal of clinical gastroenterology* **45**: 872–877.
- Takeda K, Okumura K. 2007.** Effects of a Fermented Milk Drink Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota on the Human NK-Cell Activity. *The Journal of Nutrition* **137**: 791–793.
- Tanner M., Kenyon GGL. 1998.** Inversion of Stereocenters. *Comprehensive Biological Catalysis*. San Diego: Academic Press, Chapter 21.
- Tashiro M, Tsukada K, Kobayashi S, Hayaishi O. 1961.** A new pathway of D-tryptophan metabolism: enzymic formation of kynurenic acid via D-kynurenine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **6**: 155–160.

- Timmerman HM, Niers LEM, Ridwan BU, Koning CJM, Mulder L, Akkermans LMA, Rombouts FM, Rijkers GT. 2007.** Design of a multispecies probiotic mixture to prevent infectious complications in critically ill patients. *Clinical nutrition* **26**: 450–459.
- Todorov SD, Furtado DN, Saad SMI, Gombossy de Melo Franco BD. 2011.** Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for *Lactobacillus acidophilus* La-14, a potential probiotic strain. *The New Microbiologica* **34**: 357–370.
- Toh ZQ, Anzela A, Tang MLK, Licciardi P V. 2012.** Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease. *Frontiers in Pharmacology* **3**: 171.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Jason P, Egholm M, et al. 2009.** A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**: 480–484.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007.** The human microbiome project. *Nature* **449**: 804–810.
- Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo J V., Young RJ. 1999.** *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *The Journal of Pediatrics* **135**: 564–568.
- Vivian JT, Callis PR. 2001.** Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophysical journal* **80**: 2093–2109.
- Walsh CT. 1989.** Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 2393–2396.
- Walter J, Ley R. 2011.** The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual Review of Microbiology* **65**: 411–429.
- Wang Z, Chai W, Burwinkel M, Twardziok S, Wrede P, Palissa C, Esch B, Schmidt MFG. 2013.** Inhibitory influence of *Enterococcus faecium* on the propagation of swine influenza A virus in vitro. *PloS one* **8**: e53043.
- Ward LJ, Timmins MJ. 1999.** Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* **29**: 90–92.
- Wheeler D a, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen Y-J, Makhijani V, Roth GT, et al. 2008.** The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* **452**: 872–876.
- Wyatt RJ, Engelman K, Kupfer DJ, Fram DH, Sjoerdsma A, Snyder F. 1970.** Effects of L-Tryptophan (a natural Sedative) on Human Sleep. *The Lancet*: 842–846.
- Yamamoto H, Mitsuhashi K, Tomita F, Matsuyama A. 1999.** Method for producing D-tryptophan. *Patent*.
- Yoshimura T, Esak N. 2003.** Amino acid racemases: functions and mechanisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**: 103–109.

Zakostelska Z, Kverka M, Klimesova K, Rossmann P, Mrazek J, Kopečný J, Hornová M, Srutková D, Hudcovic T, Ridl J, et al. 2011. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PloS one* **6**: e27961.

Zhao S, Liu Y-MM. 2001. Electrophoretic separation of tryptophan enantiomers in biological samples. *Electrophoresis* **22**: 2769–2774.

Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 723–735.

Abbildungsverzeichnis

Abb. A.1	Vier Bereiche des menschlichen Körpers und ihre mikrobielle Zusammensetzung im Vergleich	10
Abb. A.2	Charakteristiken des gesunden humanen Darms.....	12
Abb. A.3	Schematische Darstellung probiotischer Effekte auf die humane Immunantwort.....	17
Abb. A.4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....	18
Abb. B.1	Schematische Darstellung der emPCR Amplifizierung.....	36
Abb. B.2	Schematische Darstellung des Einbaus einer Tetracyclinresistenz mit Hilfe eines Transposons.....	41
Abb. C.1	Maximale OD ₆₀₀ verschiedener Gram-positiver Bakterien in MRS Medium und CDMI im Vergleich.	49
Abb. C.2	Wachstumskurve <i>L. casei</i> W56.....	50
Abb. C.3	HPLC-Standardgeraden für L- und D-Trp.	52
Abb. C.4	Chromatogramme der HPLC zur Berechnung der Standardgerade.	53
Abb. C.5	Ermittlung des optimalen Elutionsvolumens in der SPE.	54
Abb. C.6	Ermittlung des maximal einzusetzenden Probenvolumens.....	56
Abb. C.7	Standardgeraden für D- und L-Trp nach Optimierung des Proben- und Elutionsvolumens.....	57
Abb. C.8	Chromatogramm der CDMI-Negativkontrolle mit 50 µM L-Trp	58
Abb. C.9	Chromatogramme von <i>L. rhamnosus</i> GG und <i>L. casei</i> W56 in CDMI ohne L-Trp.	59
Abb. C.10	CDMI mit 10 µM L-Trp. C.....	60
Abb. C.11	CDMI mit 50 nM D-Trp.....	61
Abb. C.12	API50-Test für <i>L. casei</i> W56.	63
Abb. C.13	Dendrogramm für <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> W102 und <i>L. casei</i> W56 basierend auf den 16S-rRNS Analysen.....	64
Abb. C.14	Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS von <i>L. casei</i> W56 mit seinen nächsten Verwandten.....	64
Abb. C.15	Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS von <i>L. rhamnosus</i> W102 mit seinen nächsten Verwandten	65
Abb. C.16	Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNS.....	65
Abb. C.17	Längenverteilung der DNS-Fragmente in den Libraries.	66
Abb. C.18	Standardgeraden für die Quantifizierung der DNS-Libraries.	67

Abb. C.19	Längenverteilung der durch 454-Pyrosequenzierung erhaltenen Fragmente von <i>L. casei</i> W56 und <i>L. rhamnosus</i> W102.....	69
Abb. C.20	PCR-Produkte zwischen den beiden chromosomalen Contigs.....	71
Abb. C.21	Überbrücken der fehlenden Sequenzen aus der 454-Sequenzierung mit Hilfe von PCR-Amplifikaten im Chromosom.	71
Abb. C.23	Verbindung Contigs 2 und 1 in Plasmid.	72
Abb. C.22	PCR für das Produkt zwischen den Contigs 2 und 1 des Plasmids.	72
Abb. C.24	PCR-Amplifikate für den Bereich zwischen Contig 1 und 2 im Plasmid.	74
Abb. C.25	Verbindung Contigs 1 und 2 im Plasmid nach Bearbeiten der Enden.....	75
Abb. C.26	Schematische Darstellung der Strategie zur Bestimmung der Position und Orientierung der Transposons.....	76
Abb. C.27	PCR-Produkte im Bereich der Transposons.....	76
Abb. C.28	Schematische Darstellung der Knock-Out-Mutagenese mittels homologer Rekombination.....	80
Abb. C.29	Wachstum <i>L. casei</i> W56 bei verschiedenen Temperaturen.....	82
Abb. C.30	Kolonie-PCR pGh9 zur Überprüfung der Transformation.	83
Abb. C.31	Verlust des Plasmids pGh9 und damit der Ery-Resistenz in <i>L. casei</i> W56 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.	84
Abb. C.32	Überprüfung der Klonierung von <i>trpC</i> hom in pSCA.....	85
Abb. C.33	Screening nach Kolonien die Tn5 im Bereich um <i>trpC</i> hom eingebaut haben. ...	86
Abb. C.34	Schematische Darstellung der Primerbindepositionen für die Sequenzierung der Insertionskassette.....	86
Abb. C.35	Schematische Darstellung der Anordnung von Tn5	87
Abb. C.36	Bestimmung der Richtung des eingebauten Inserts	88
Abb. C.37	Übersicht Plasmidkonstruktion.....	89
Abb. D.1	Tryptophan in der L- und D-Form.....	90
Abb. D.2	Biosyntheseweg von L-Tryptophan	92
Abb. D.3	Schematische Darstellung der Selektion mit Hilfe eines temperatursensitiven Plasmids.	104
Abb. G.1	„TARC-Assay“.....	126
Abb. G.2	„Cytokin-Test“.....	127
Abb. G.3	Immunmodulatorische Aktivitäten der Methanol-Fractionen.....	128
Abb. G.4	UPLC-PDA Chromatogramm der 20%-MeOH-Fraktion.....	129
Abb. G.5	NMR-Spektrum des aktiven Peaks aus den Subfraktionen 7 und 8 von <i>L. rhamnosus</i> GG und <i>L. casei</i> W56	129

Abb. G.6	Vergleich der UPLC-FLR Chromatogramme der gereinigten Subfraktion.....	130
Abb. G.7	Immunmodulatorische Aktivität von L- bzw. D-Tryptophan.....	131
Abb. G.8	Ergebnisse aus dem „Cytokin-Test“ der D-Aminosäuren.....	131
Abb. G.9	Prozenttabelle API50.	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle B-1	Verwendete Bakterienstämme.....	23
Tabelle B-2	CDMI	26
Tabelle B-3	Vitaminlösung für CDMI. Angabe der Endkonzentrationen in CDMI.....	27
Tabelle B-4	DML.....	27
Tabelle B-5	Verwendete Antibiotika	28
Tabelle B-6	Verwendete Plasmide	30
Tabelle B-7	Verwendete Primer	32
Tabelle B-8	Verwendete Primer zur Sequenzierung der 16S-rDNS	37
Tabelle C-1	Ermittlung des optimalen Elutionsvolumens in der SPE.....	55
Tabelle C-2	Ermittlung des maximal einzusetzenden Probenvolumens.	56
Tabelle C-3	Erhöhung des Sensitivitätsbereichs	57
Tabelle C-4	Fluoreszenzwerte und Konzentrationen der Libraries	67
Tabelle C-5	Angereicherte Beads für L. casei W56.....	68
Tabelle C-6	Angereicherte Beads für L. rhamnosus W102.....	68
Tabelle C-7	Statistischer Überblick über die Sequenzierungen	69
Tabelle C-8	Vergleich der erwarteten und erhaltenen Fragmentlängen aus der PCR im Bereich der Verbindung zwischen Contig 1 und 2.....	74
Tabelle C-9	Übersicht über die Transposons in L. casei W56.	77
Tabelle C-10	Untersuchung der Antibiotikaresistenzen von L. casei W56 in Flüssigkultur.	81

G Anhang

G.1 Ergebnisse der immunologischen und chemischen Analysen des Verbundprojekts

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse aus dem immunologischen Bereich wurden von Inge Kepert durchgeführt, die analytische Chemie von Juliano Fonseca.

G.1.1 Bioassays zur Bestimmung immunmodulatorischer Aktivität bakterieller Überstände

Zur Bestimmung der immunmodulatorischen Aktivität der bakteriellen Überstände dienten zwei unabhängige Testsysteme. Die beiden Bioassays zielten auf unterschiedliche immunologische Reaktionen menschlicher Zellen ab. Im ersten Bioassay wurde die Sekretion des „Thymus and Activation Regulated Chemokine“ (TARC) in einer Hodgkin-Lymphoma-Zelllinie (KM-H2), die dieses konstitutiv exprimiert, untersucht. TARC gilt als Marker für Neurodermitis (Hijnen *et al.*, 2004). Die Zugabe von Zellüberständen aktiver Bakterienstämme konnte die TARC-Expression in den KM-H2 Zellen herabregulieren (Abb. G.1). In dem zweiten Test („Cytokin-Test“) wurden dendritische Zellen mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert und die Ausschüttung der bei der Immunantwort im Menschen beteiligten Cytokine gemessen. Auch diese wurde durch die Zugabe aktiver Zellüberstände herabreguliert (Abb. G.2).

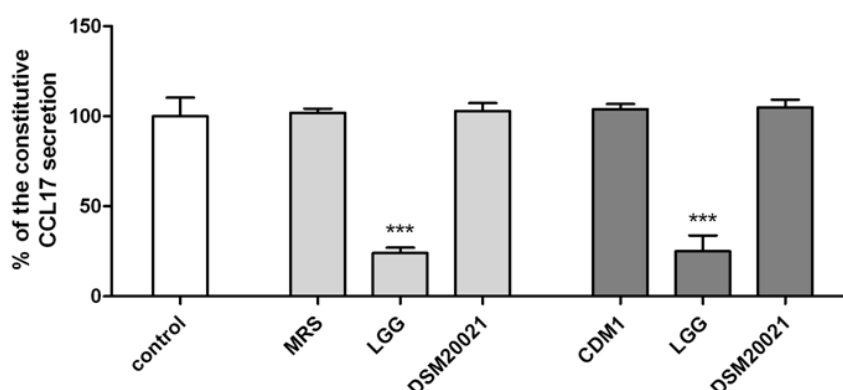


Abb. G.1 „TARC-Assay“. Vergleich eines immunologisch aktiven (LGG) und eines nicht immunologisch aktiven (DSM20021) *Lactobacillus rhamnosus*. Es gab keine Unterschiede zwischen der Verwendung von Vollmedium (MRS, hell grau) und definiertem Medium (CDMI, dunkel grau). (Kepert *et al.*, eingereicht)

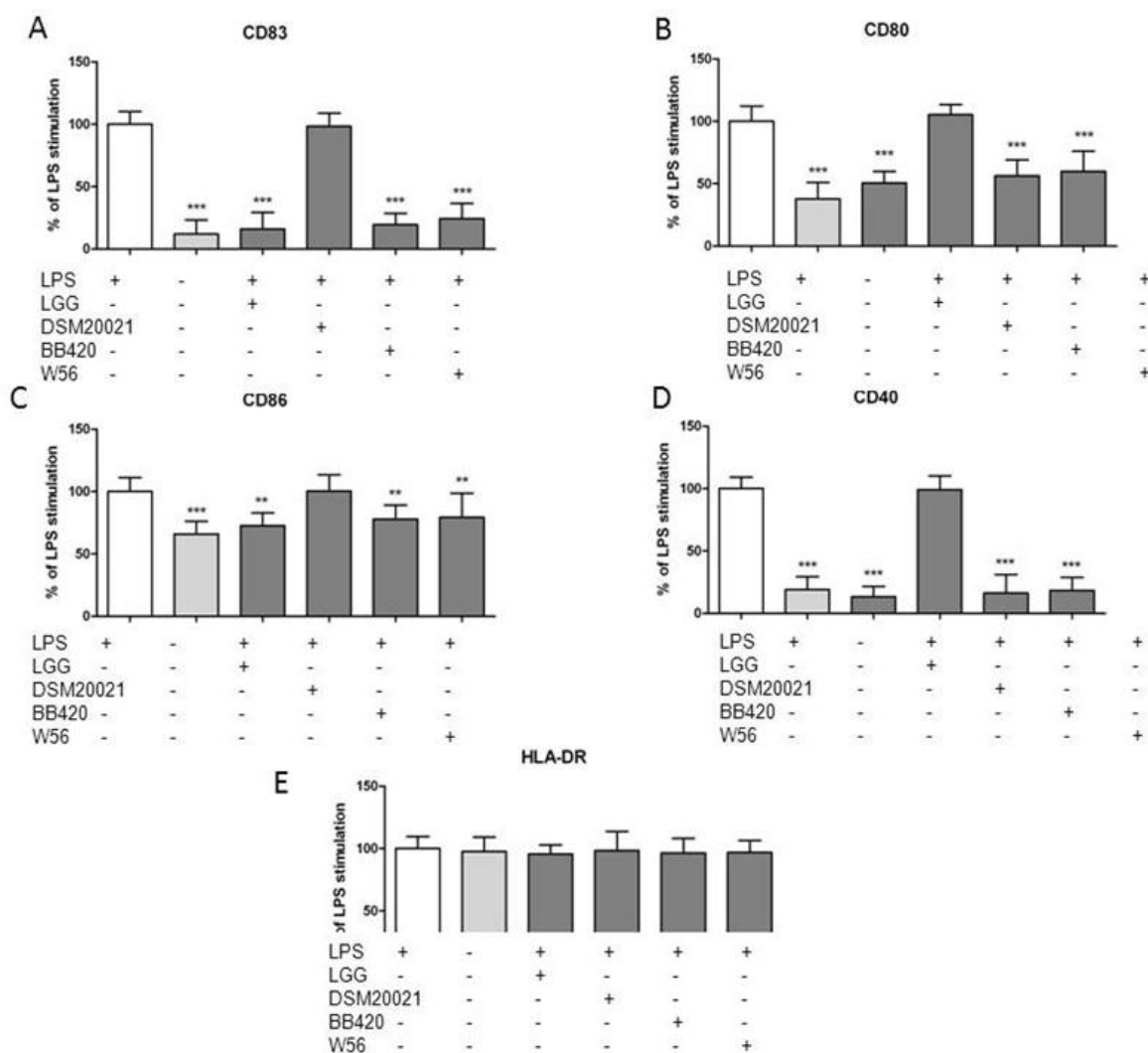


Abb. G.2 „Cytokin-Test“. Vergleich immunologisch aktiver Stämme (LGG, BB420, W56) und eines nicht immunologisch aktiven *Lactobacillus rhamnosus* (DSM20021) im Hinblick auf die durch LPS induzierten Cytokin-Werte. (Kepert *et al.*, eingereicht).

Für 17 der 46 getesteten Stämme konnte mit beiden Systemen immunmodulatorische Aktivität nachgewiesen werden (Kepert *et al.*, eingereicht). Als Beispielorganismen für die weiteren Experimente wurden *L. casei* W56 und *L. rhamnosus* GG als aktive Stämme, *L. rhamnosus* W102 als negativer Referenzstamm, gewählt.

G.1.2 Fraktionierungen

Wie bereits im Ergebnisteil dargestellt, erfolgte die Isolierung von D-Tryptophan über zwei Fraktionierungsschritte. Bei der ersten Fraktionierung mit Hilfe steigender Methanol-Konzentrationen über SPE, konnte in der 20%-, 40%- und 50%-Methanol-Fraktion

immunologische Aktivität nachgewiesen werden. In Abb. G.3 sind die Ergebnisse aus dem entsprechenden TARC-Test dargestellt.

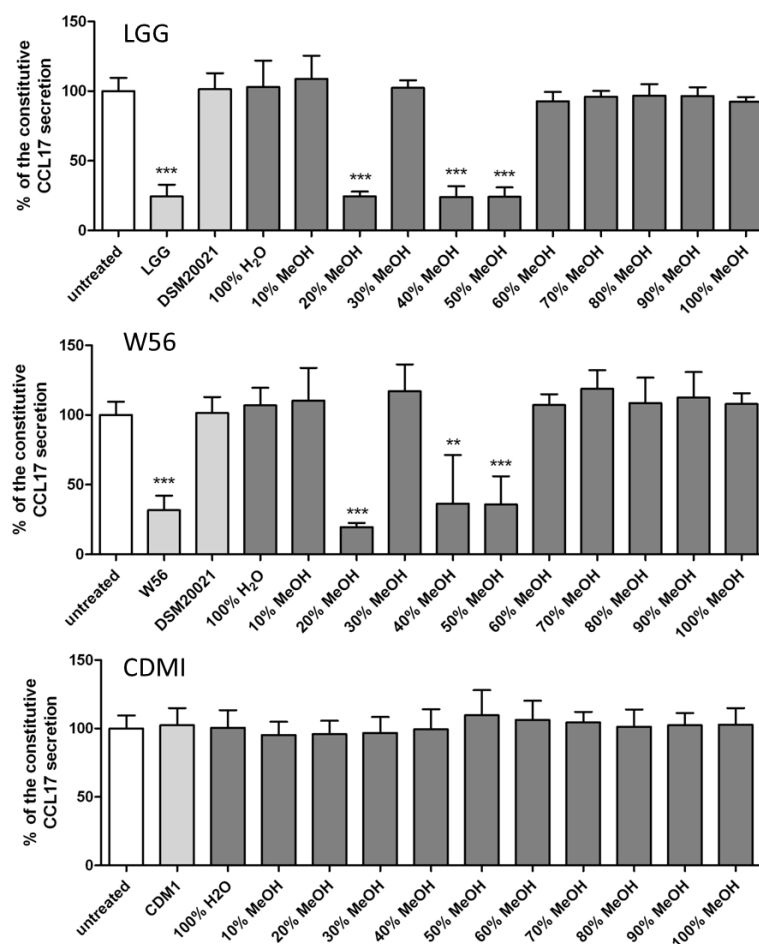


Abb. G.3 Immunmodulatorische Aktivitäten der Methanol-Fractionen von *L. rhamnosus* GG (LGG), *L. casei* W56 und dem verwendeten Medium (CDMI) zur Kontrolle (Kepert et al., eingereicht).

Da sich in der 20%-MeOH-Fraktion die höchste Aktivität zeigt wurde diese zunächst für die zweite Fraktionierung über UPLC gewählt. Von den zehn erhaltenen Subfraktionen (Abb. G.4) zeigten Fraktion 7 und 8 positive Ergebnisse in den immunologischen Tests. In den übrigen Fraktionen konnte keine Aktivität festgestellt werden.

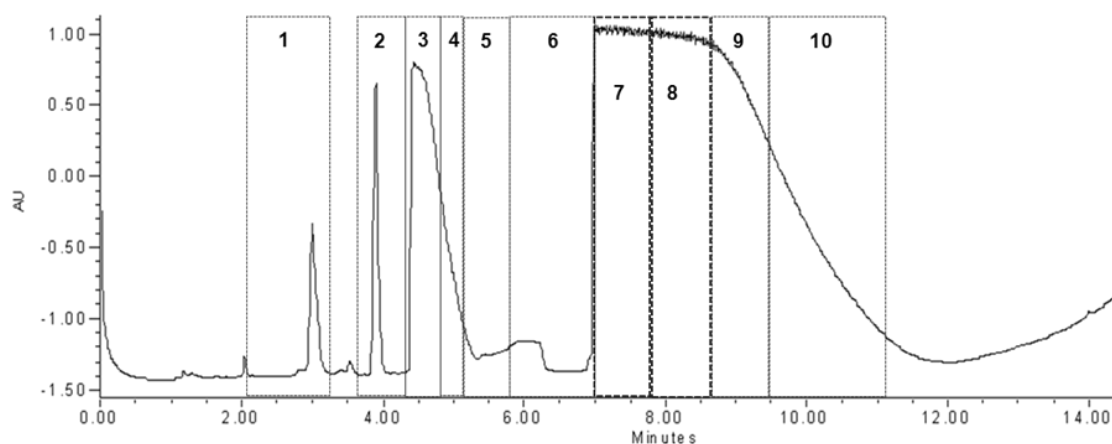


Abb. G.4 UPLC-PDA Chromatogramm der 20%-MeOH-Fraktion des zellfreien Überstands von *L. casei* W56 (Quelle: Juliano Fonseca).

In diesen Fraktionen konnte schließlich, mit Hilfe von “Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry” (FT-ICR-MS) und “Nuclear Magnetic Resonance” (NMR), Tryptophan als aktive Struktur identifiziert werden (Abb. G.5). Anhand des NMR-Spektrums kann jedoch nicht zwischen L- und D-Tryptophan unterschieden werden (Kepert *et al.*, eingereicht).

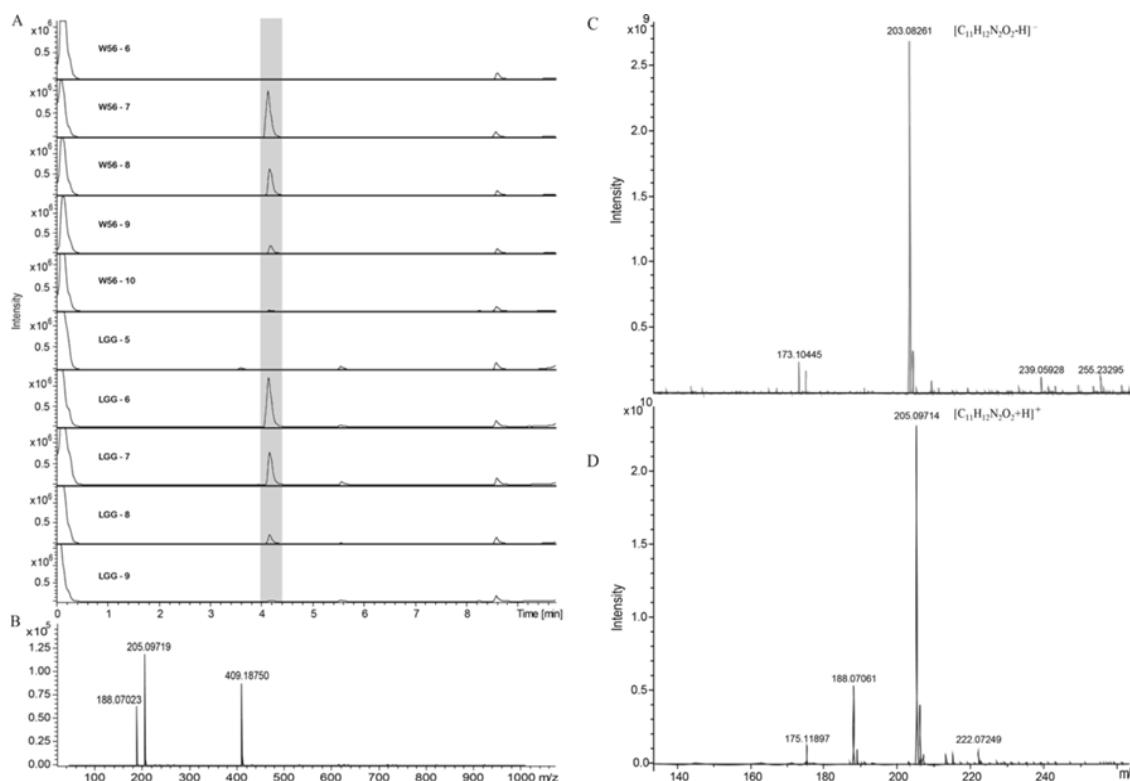


Abb. G.5 NMR-Spektrum des aktiven Peaks aus den Subfraktionen 7 und 8 von *L. rhamnosus* GG und *L. casei* W56 (links). Im Vergleich die NMR-Spektren von L-Tryptophan (rechts).

Zur Unterscheidung zwischen den Tryptophan-Isomeren wurden die Subfraktionen mit O-Phthaldialdehyd und N-Isobutyryl-L-Cysteine derivatisiert. Anhand von UPLC-Analysen (Abb. G.6) der gereinigten und derivatisierten Subfraktionen konnte gezeigt werden, dass in den immunologisch aktiven Fraktionen, im Gegensatz zur Medium-Kontrolle, D-Tryptophan nachweisbar ist (Kepert *et al.*, eingereicht).

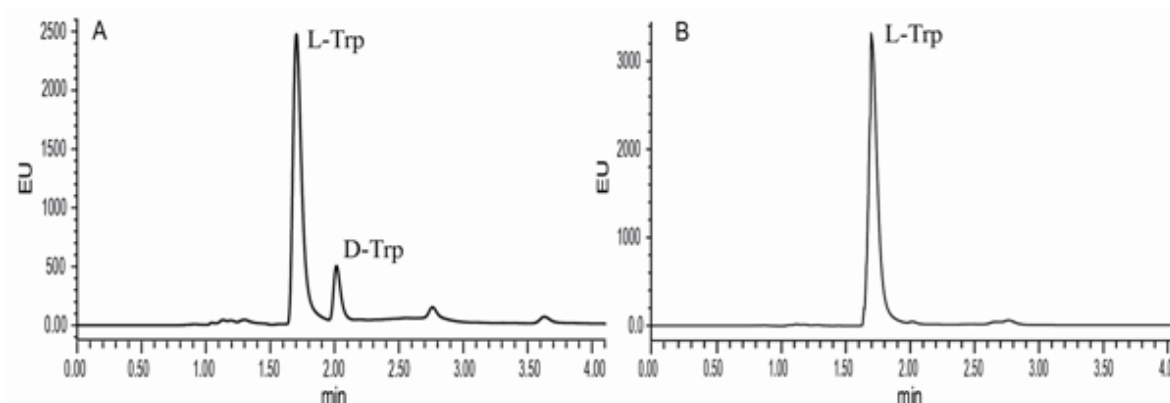


Abb. G.6 Vergleich der UPLC-FLR Chromatogramme der gereinigten Subfraktion 7 von LGG (A) und CDM1 (B) ($\lambda=300$ nm Anregungswellenlänge; $\lambda=445$ nm Emissionswellenlänge)

G.1.3 Identifikation des D-Isomers und Vergleiche mit anderen Aminosäuren

Im nächsten Schritt wurden L- bzw. D-Tryptophan als Reinsubstanz in die biologischen Testsysteme in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (Abb. G.7). Dabei zeigte sich nur das D-Isomer immunmodulatorisch aktiv. Eine erste signifikante Reduzierung der TARC-Exkretion zeigte sich ab einer D-Tryptophan-Konzentration von 10 nM, die volle Aktivität zeigte sich ab einer Konzentration von 100 nM.

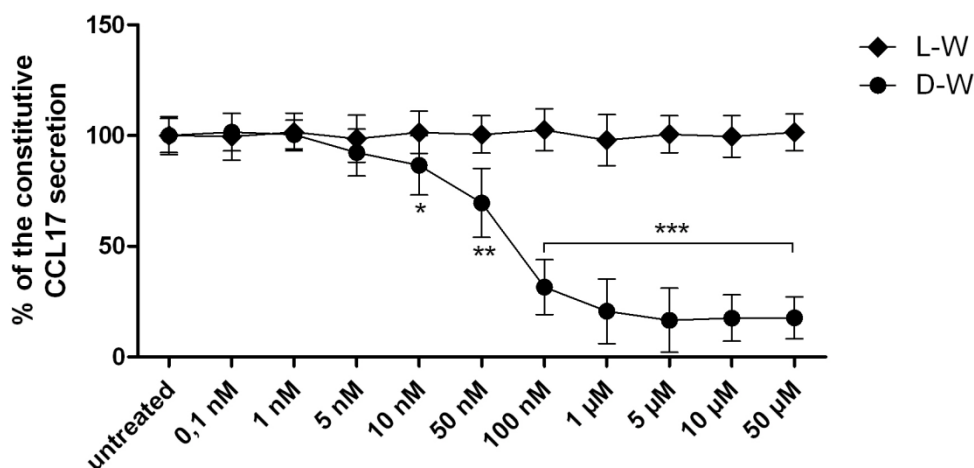


Abb. G.7 Immunmodulatorische Aktivität von L- bzw. D-Tryptophan (L-W bzw. D-W) verschiedenen Konzentrationen (Kepert et al., eingereicht).

Darüber hinaus wurde auch die Aktivität anderer Aminosäuren getestet. Jedoch konnte bei keiner ein Effekt wie für D-Tryptophan festgestellt werden. In Abb. G.8 sind die Ergebnisse aus dem „Cytokin-Test“ für die D-Isomere dargestellt.

	D-Alanine	D-Histidine	D-Isoleucine	D-Leucine	D-Methionine	D-Phenylalanine
CD83	97.67 ± 2.29	103.09 ± 0.33	100.51 ± 1.18	97.07 ± 2.39	102.40 ± 2.19	99.55 ± 2.02
CD86	99.24 ± 2.13	102.49 ± 0.43	99.84 ± 1.19	101.94 ± 1.34	102.22 ± 2.53	99.19 ± 3.33
CD80	98.34 ± 2.64	102.02 ± 0.88	98.23 ± 1.48	100.28 ± 1.55	100.39 ± 0.15	92.40 ± 3.45
CD40	102.34 ± 3.36	101.44 ± 3.22	100.43 ± 2.41	100.37 ± 1.72	102.66 ± 0.60	100.35 ± 2.72
HLA-DR	98.06 ± 1.06	99.85 ± 0.93	100.08 ± 0.33	98.95 ± 9.97	98.91 ± 2.02	98.02 ± 3.17

	D-Proline	D-Serine	D-Threonine	D-Tryptophan	D-Tyrosin	D-Valine
CD83	100.98 ± 0.40	100.78 ± 0.29	102.62 ± 0.46	7.63 ± 3.31	101.63 ± 0.56	102.06 ± 1.20
CD86	101.18 ± 1.85	101.08 ± 2.76	102.09 ± 0.68	24.14 ± 2.67	102.23 ± 0.85	101.77 ± 0.87
CD80	100.32 ± 0.10	100.13 ± 2.78	100.76 ± 0.35	12.11 ± 1.68	101.62 ± 0.37	99.62 ± 2.03
CD40	99.19 ± 1.33	100.78 ± 1.12	100.56 ± 1.49	15.18 ± 6.51	100.37 ± 1.25	101.42 ± 2.35
HLA-DR	98.39 ± 2.60	98.64 ± 0.58	97.06 ± 3.91	88.85 ± 2.96	98.43 ± 2.42	100.02 ± 1.02

Abb. G.8 Ergebnisse aus dem „Cytokin-Test“ der D-Aminosäuren. Dargestellt ist die prozentuale Herabregulierung der Cytokin-Expression (Kepert et al., eingereicht).

G.2 API50

Kohlenhydrat		CTRL	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	Frau	MNE	SBE	RHA	DUL
<i>L.paracasei</i>	ssp. 1	0	20	0	1	0	100	0	0	13	0	100	100	100	100	53	1	13
	ssp. 2	0	16	0	16	0	100	0	0	33	0	100	100	100	100	50	1	50
	ssp. 3	0	0	0	0	0	98	0	0	0	1	100	100	100	100	20	1	0
<i>L.rhamnosus</i>		0	42	0	9	8	100	0	0	0	0	100	100	100	100	92	100	14
W56																		
Kohlenhydrat		INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU
<i>L.paracasei</i>	ssp. 1	6	100	86	0	46	100	95	100	99	100	93	99	99	0	93	99	26
	ssp. 2	33	100	100	0	83	100	75	100	83	99	65	99	0	0	99	99	66
	ssp. 3	0	80	20	0	0	100	99	100	80	100	100	80	80	0	60	99	20
<i>L.rhamnosus</i>		42	100	100	7	85	100	99	100	100	85	100	99	100	9	71	99	0
W56																		
Kohlenhydrat		MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG	
<i>L.paracasei</i>	ssp. 1	93	0	0	6	0	80	80	20	100	0	1	0	40	93	0	0	
	ssp. 2	99	0	0	0	0	66	100	16	100	0	0	0	0	83	0	0	
	ssp. 3	20	0	0	0	0	100	20	0	60	0	0	0	0	20	0	0	
<i>L.rhamnosus</i>		99	7	0	0	0	85	92	42	99	0	7	0	7	85	0	0	
W56																		

Abb. G.9 Prozenttabelle API50. Prozent der positiven Reaktionen laut Hersteller und Ergebnisse für W56

>90% 89-50% 49-11% <10%

G.3 Sequenz der Insertionskassette

Anfang und Ende sind die zu *trpC* homologen Bereiche (blau, *trpC* hom), der Mittelteil wird aus der Sequenz von Tn5 (grün) gebildet

AGCCGGATTTTCTAACACGCTTAAACAACCTGGCCTACACGTGATCGCTGAGGTCAAAAAGGCCTCGCCATCAAAGGGGACAAT
 TGTACAGATTTTCCCTACTTGGCGATCGCCAAAGCGTACGATCAAGCCGGTGCCGATGCTATCTCGGTCTTGACCGAACCCGAT
 TATTTCAACGGCCACCTTCATTATCTAAAGGAAATCAGCCAACAAGTGTCTGGTGCCAACGCTTCGAAAAGATTTTACGATTGATC
 CTTATATGATCCTGTCTCTTATACACATCTCAACCATCATCGATGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCATCTTATTAATCAGA
 TAAATATTTCTAGATTTTCAGTGCAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTCTC
 ATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCAGAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAA
 ATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGTTATGCCGGTACTGCCGGGC
 CTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTAT
 GCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCTGCTCGCTTCGCTACTTGAGCCACTATCGACTA
 CGCGATCATGGCGACCACACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGCGCCACAGGTGCGGTT
 GCTGGCGCCTATATCGCCGACATACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTA
 TGGTGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGCGCCATCTCCTTGATGCACCATTCCTTGCGGCGCGGGTGTCAACGGCCT
 CAACCTACTACTGGGTGCTTCTTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTC
 AGCTCCTTCCGGTGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGC
 CGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTGCGTTGCGGTATTCGGAAT
 CTTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACCTGGTCCCGCCACAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCG
 GCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCG

GCATCGGGATGCCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGC
TCTTACCAGCCTAACTTCGATCATTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTGGCA
TGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGG
AAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCACTACTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACC
AACCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCGCACGCGGCGCATCTCGGGCACGTTGGGTCTTGCCACGG
GTGCGCATGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCAGGGTTGAGATGTGTATAAGAGACAGATATGATCTACGAGG
CTAAGGCAAACGGGGCTGTCATTATTTTACTGATTGTTGCGATCCTAACCGATCAGCAATTGCGCGATTATCGCCAACCTGGCTGA
AAACTCGGTATGCACGCAATTGTCGAGGCCTATACAGCCGCTGAGGTCACACGGGCACTACAGTCAGGTGCAAAGATAATCGGC
ATTAACAACCGGAATCTCAAAGACTTTCGAGTTGATTTCACAATAGTTTGAAATTAAGAGCCATGGTGCCCGACAACATCCCCG
TCGTTG

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

.....

(Unterschrift)

Danksagung

Abschließend gilt mein herzlicher Dank den folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten, sowie für die Unterstützung bei allen größeren und kleineren Schwierigkeiten.

Frau Prof. Dr. Kirsten Jung für die Korrektur und die Erstellung des Zweitgutachtens und allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Dr. Michael Schmid für die Betreuung, die Berechnungen mit ARB, die netten Gespräche und die Hilfe bei allen Problemen die rund herum aufgetreten sind.

Dr. Michael Rothballer für sehr viel Hilfe und Geduld bei tausend Fragen, die Aufmunterung und Unterstützung, wenn die Frustrationsgrenze einmal wieder überschritten war und die netten Gespräche in unserem Büro.

Angelo Weiß für die Hilfe im Labor und all die lustigen Kaffeepausen.

Allen Mitgliedern der AMP für die Hilfe, die gute Stimmung und die schöne Zeit mit Gesprächen, die so vieles leichter gemacht haben.

Prof. Dr. Peter Schröder und seinem HPLC-Team, besonders Max Krönauer, Rudi Harpaintner und Dr. Christian Huber, für die Einführung in die HPLC, sowie die Bereitstellung der Geräte, die Hilfe bei Problemen und die Geduld, wenn es doch wieder einen Monat länger gedauert hat.

Barbara Pfitzner ohne die meine erste Veröffentlichung vermutlich später stattgefunden hätte.

Allen meinen Kooperationspartnern für die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Karl-Werner Schramm und Prof. Dr. Vasilis Ntziachristos für die Bereitstellung ihrer Zellkultur-Anlagen.

Meinen Eltern die mir dies alles ermöglicht haben und bei denen ich immer Rückhalt gefunden habe.

Und meinem wunderbaren Florian für das Korrekturlesen und dafür, dass er alle Höhen und Tiefen mit mir durchgestanden hat und immer für mich da war.

Lebenslauf

Kerstin Hochwind, geboren am 09.01.1983 in Rosenheim

Schulausbildung

Sep 1993 – Jul 1997	Finsterwalder Gymnasium, Rosenheim
Sep 1997 – Mai 2003	Gymnasium Raubling Allgemeine Hochschulreife, einschließlich Latinum

Studium

Okt 2003 – Jan 2009	Immatrikuliert an der Universität Regensburg, Studiengang Biologie (Diplom) Schwerpunkte: Zellbiologie, molekulare Mikrobiologie
Sept 2006 – Dez 2006	Erasmusaufenthalt am University College Dublin Forschungspraktikum bei Prof. Bolger (Zoologie) Forschungspraktikum bei Prof. Butler (Zellbiologie)
Okt 2007 – Feb 2008	Betreuung des Mikrobiologischen Grundkurses
Jan 2008 – Jan 2009	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie: „Entwicklung eines Sequenzspezifischen qPCR-Detektionssystem für den Nachweis von <i>Clostridium tyrobutyricum</i> (Multiplexsystem)“

Promotion

Juni 2009 - Dez 2013	Promotion an der LMU München, durchgeführt in der Abteilung Mikrogen-Pflanzen-Interaktionen am Helmholtz Zentrum München: „Untersuchungen zum Genom und dem immunologisch aktiven D-Tryptophan im probiotischen <i>Lactobacillus casei</i> W56 im Vergleich mit anderen probiotischen Lactobacillen“
----------------------	--